

# Micro-oxigenação em vinho tinto da Região Demarcada do Douro Efeitos na composição físico-química, microbiológica e sensorial

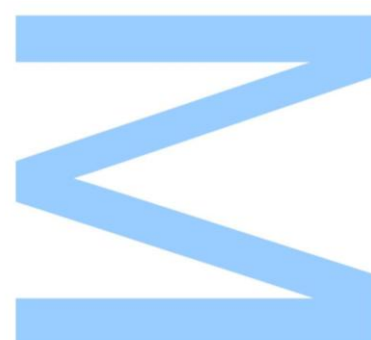
Patrícia Alexandra Almeida da Cruz

Mestrado de Viticultura e Enologia  
2014

**Orientador**

Victor de Freitas, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

**Coorientador**



***Dedico esta, assim como as demais conquistas, aos meus pais.  
(em memória da minha mãe)***

# Agradecimentos

Ao concluir esta etapa da minha vida, lembro-me de muitas pessoas, a quem ressalto reconhecimento e admiração, e que de alguma forma me encorajaram para regressar à Faculdade. Esta conquista concretiza-se com a contribuição de cada um de vós (família, amigos, professores, companheiros de vindima e conhecidos), que nas minhas variadas aventuras marcaram a minha Vida.

Quero agradecer em primeiro lugar à minha família que me incentivou e sempre acreditou nesta minha decisão. Sem o seu apoio, esta conquista não seria possível.

Ao Professor Doutor Victor De Freitas, que o acaso fez com que me recebesse em Lisboa na minha primeira aula deste Mestrado, a ele agradeço toda a disponibilidade para a orientação, os ensinamentos e incentivo que tornaram possíveis o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Agradeço à Empresa Adriano Ramos Pinto pela cedência das amostras.

Ao Professor Doutor Nuno Mateus pelo convívio, apoio e amizade.

À Doutora Natércia Teixeira e Doutora Mara Alinho, um especial obrigada pela disponibilidade e ensinamentos.

Não posso deixar de agradecer aos Professores: Doutor Jorge Ricardo da Silva (Instituto Superior de Agronomia), Doutor José Couto (Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa) e Doutora Elsa Gonçalves (Instituto Superior de Agronomia), pela disponibilidade e bons conselhos.

Um especial agradecimento ao Doutor José Santos por todo o seu apoio, a sua disponibilidade e a sua colaboração neste trabalho.

A todos os meus amigos e companheiros do Laboratório de Química Orgânica, um muito obrigada pelo bom companheirismo e apoio constantes.

Sem esquecer os meus companheiros e grandes amigos deste Mestrado, obrigada pelos bons momentos passados ora em estudo, visitas, provas, convívios. Sem dúvida que são amizades que irão permanecer.

Sempre se é feliz quando se tem bons amigos. Cristiana Gomes é sem dúvida uma amiga que não poderei esquecer pela maneira como me acolheu em Lisboa. Obrigada pelo apoio, confiança e amizade que nos une há alguns anos.

To all my friends all over the world, especially Kryz Smith, Albane Bervas and Florence Hivert, thanks for your support and good advices.



# Índice geral

Resumo	1
Abstract	3
Introdução	4
1. Cor, sabor e aroma	4
2. Compostos fenólicos	7
2.1. Compostos fenólicos nos vinhos: substratos para oxidação	8
2.2. Compostos flavonóides	8
2.2.1. Flavanóis	8
2.2.2. Flavonóis	14
2.2.3. Pigmentos antociânicos	15
2.2.3.1. Influência do pH na cor das antocianinas	18
2.2.3.2. Reação das antocianinas com o bissulfito	19
2.2.3.3. Reação das antocianinas com os taninos	20
2.2.3.4. Reação das antocianinas com os metais (metaloantocianinas)	20
2.2.3.5. Copigmentação	20
3. Compostos não-flavonóides	21
4. Polissacáridos	23
5. Micro-oxigenação	25
5.1. Influência do oxigénio na cor e sabor dos vinhos	27
5.2. Oxigénio e fenóis	28
5.3. Alterações na estrutura e aroma dos vinhos: efeito do oxigénio no corpo e adstringência	30
5.4. Melhoria do vinho: diminuição dos aromas vegetais e reduzidos	30
5.5. Simulação do envelhecimento em barrica	32
5.6. Uso da micro-oxigenação	33
5.6.1. Equipamento necessário	33
5.6.2. Novos equipamentos	35
5.7. Características iniciais do vinho	37
5.8. Concentração de SO <sub>2</sub> presente no vinho	38
5.9. Momento de aplicação da micro-oxigenação	40
5.10. Fases envolvidas na micro-oxigenação	41
5.10.1. Fase de "Estruturação"	42
5.10.2. Fase de "Harmonização"	43
5.10.3. Fase de "Saturação"	44

5.11. Quantidade de oxigénio adicionada	44
5.12. Temperatura	45
5.13. Riscos que envolvem a micro-oxigenação	45
6. Evolução das características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de vinhos	46
6.1. Acetaldeído	46
6.2. Bactéria ácido-acética	48
6.3. O "amanteigado" - atributo indesejável no vinho	49
6.3.1. Controlo potencial do crescimento da bactéria ácido-lática pelos compostos fenólicos	51
6.4. <i>Dekkera/Brettanomyces</i>	52
Enquadramento temático	55
Objetivo	56
Palavras-chave	56
Keywords	56
Material e métodos	57
1. Estudo da composição polifenólica dos vinhos	57
1.1. Índice de fenóis totais	57
1.2. Taninos proantociânicos totais	58
1.3. Poder tanante	59
1.4. Índice de diálise	59
1.5. Análise da cor	60
1.5.1. Índice de cor vermelha	60
1.5.2. Intensidade corante	60
1.5.3. Tonalidade	61
1.5.4. Antocianinas livres totais	62
1.5.5. Antocianinas 3-monoglucósidas livres	62
2. pH	63
3. Teste de estabilidade oxidativa em vinho tinto	63
4. Polissacáridos	66
5. Análises enzimáticas	66
5.1. Pesquisa D-Glucose + D-Fructose	66
5.2. Pesquisa ácido L-málico	67
5.3. Acidez volátil	68
6. Pesquisa de <i>Dekkera/Brettanomyces</i>	68
7. Análise sensorial	70

8. Análise estatística	72
Resultados	73
1. Estudo da composição polifenólica dos vinhos	73
1.1. Índice de fenóis totais	73
1.2. Taninos proantociânicos totais	74
1.3. Poder tanante	74
1.4. Índice de diálise	76
1.5. Análise da cor	77
1.5.1. Intensidade corante e índice de cor vermelha	77
1.5.2. Tonalidade e % de cor	79
1.6. Análise das antocianinas livres totais e antocianinas 3-monoglucósidas livres	81
1.6.1. Antocianinas livres totais	81
1.6.2. Antocianinas 3-monoglucósidas livres	81
1.7. Teste de estabilidade oxidativa em vinho tinto	84
1.8. Polissacáridos	84
1.9. pH	85
1.10. Análises enzimáticas	86
1.11. Pesquisa de <i>Dekkera/Brettanomyces</i>	86
1.12. Análise sensorial	89
Discussão dos resultados	91
Conclusão	94
Perspetivas futuras	95
Bibliografia	96
Webgrafia	128

## Índice de figuras

Figura 1- Localização dos diferentes compostos nas diferentes partes da uva (adaptado Coombe 1987).	4
Figura 2 - Estrutura geral dos flavan-3-óis (adaptado de Garrido e Borges 2013).	9
Figura 3 - Estrutura dos flavan-3-óis mais abundantes no vinho.	9
Figura 4 - Decomposição das proantocianidinas por aquecimento em meio ácido (reação de Bate-Smith) (adaptado de Bate Smith 1954).	11
Figura 5 - Estruturas das procianidinas diméricas do tipo B.	12
Figura 6 - Estrutura do dímero B2-3"-O-galhato.	12
Figura 7 - Estrutura da procianidina dimérica do tipo A.	13
Figura 8 - Esquema geral das proantocianidinas polimerizadas.	13
Figura 9 - Estrutura dos flavonóis (adaptado de Oliveira et al. 2011).	14
Figura 10 - Catião flavílio.	15
Figura 11 - Estruturas das antocianidinas correspondentes para os diferentes substituintes (adaptado Oliveira et al. 2011).	15
Figura 12 - Estrutura das antocianidinas 3-monoglucosídicas e respectivos ésteres acilados.	16
Figura 13 - Estrutura das piranoantocianinas mais comuns no vinho (adaptado de Rentzsch et al. 2007).	17
Figura 14 - Equilíbrio das antocianinas em meio aquoso a diferentes valores de pH (adaptado Oliveira et al. 2014).	18
Figura 15 - Equação química que traduz a reação do bissulfito com as antocianinas.	19
Figura 16 - Estrutura geral dos ácidos benzóicos e cinâmicos (adaptado de Oliveira et al. 2011).	22
Figura 17 - Estrutura geral dos estilbenos.	22
Figura 18 - Compostos não-flavonóides mais comuns no vinho (adaptado de Oliveira et al. 2011)	23
Figura 19 - Mecanismos mais prováveis para a redução do oxigénio no vinho (adaptado de Waterhouse e Laurie 2006).	29
Figura 20 - Representação esquemática de um sistema micro-oxigenado (adaptado de Gómez-Plaza e Cano-López 2011).	33
Figura 21 - Representação esquemática do sistema de incorporação de oxigénio no vinho (adaptado de Dykes e Kilmartin 2007).	34
Figura 22 - Micro-oxigenador usado pela empresa : "Este aparelho enológico da Parsec é o único produto no mercado capaz de dosear a quantidade de oxigénio	35



durante o processo enológico, com precisão e credibilidade, recorrendo à equação dos gases perfeitos (  $P.V = n.R.T$  )."

Figura 23 - Cinética do consumo de oxigénio de um vinho (Cabernet Sauvignon) antes e após filtração (adaptado de Dykes e Kilmartin 2007). 37

Figura 24 - Evolução das fases organoléticas do vinho durante o processo de micro-oxigenação (adaptado de Lemaire 1995). 42

Figura 25 - Temperatura aconselhada para as diferentes doses de O<sub>2</sub> (excepto vinificação) (adaptado de [www.oenodev.com/elevage\\_temperature.asp](http://www.oenodev.com/elevage_temperature.asp)). 45

Figura 26 - Polimerização taninos-antocianinas mediados pela ponte acetaldeído (adaptado de [oenodev.com](http://oenodev.com)). 47

Figura 27 - Metabolismo do ácido cítrico por *Oenococcus oeni* (adaptado de Ramos et al, 1995). (1) citrato-liase; (2) oxaloacetato; (3) piruvato descarboxilase; (4) síntese  $\gamma$ -acetolactato; (5)  $\gamma$ -acetolactato descarboxilase; (6) diacetil redutase; (7) acetoína redutase; (8) lactato dehidrogenase; (9) complexo piruvato dehidrogenase; (10) acetato quinase; (11) descarboxilação não enzimática de  $\gamma$ -acetolactato; (12) aspartato aminotransferase. TTP, tiamina PPi. 50

Figura 28 - Índice de fenóis totais dos ensaios Inox (Testemunho), das amostras micro-oxigenadas com diferentes concentrações de oxigénio e Lote. 73

Figura 29 - Taninos dos ensaios Inox (Testemunho), das amostras micro-oxigenadas com diferentes concentrações de oxigénio e Lote. 74

Figura 30 - Poder tanante dos ensaios Inox (Testemunho), das amostras micro-oxigenadas com diferentes concentrações de oxigénio e Lote. 75

Figura 31 - Índice de diálise entre o ensaio Inox (Testemunho) , os ensaios micro-oxigenados e o ensaio Lote. 76

Figura 32 - Intensidade corante entre o ensaio Inox (Testemunho) e os ensaios micro-oxigenados 77

Figura 33 - Índice de cor vermelha do ensaio Inox (Testemunho) e dos ensaios sujeitos a micro-oxigenação com diferentes concentrações de oxigénio e Lote. 78

Figura 34 - Tonalidade dos ensaios Inox (Testemunho), dos ensaios micro-oxigenados com diferentes concentrações de oxigénio e Lote. 79

Figura 35 - Percentagem de cor dos diferentes ensaios. 80

Figura 36 - Comparação da concentração em antocianinas livres totais (mg/L) entre o ensaio Inox (Testemunha) e os ensaios micro-oxigenados. 81

Figura 37 - Cromatograma obtido por HPLC das antocianinas 3-monoglucósidas presentes no ensaio Testemunho. 82

Figura 38 - Comparação da concentração relativa de antocianinas 3-monoglucósidas 83

entre o ensaio Inox (Testemunho) e os ensaios micro-oxigenados e Lote.

Figura 39 - Comparação da concentração de polissacáridos entre o ensaio Inox (Testemunho) e os ensaios micro-oxigenados. 84

Figura 40 - pH dos ensaios Inox, com micro-oxigenação a diferentes concentrações e Lote. 85

Figura 41 - Placas de Petri após 7 dias em estufa a 30°C: a) Amostra MO 0,5 mg/L/mês; b) Amostra MO 1,0 mg/L/mês. 87

Figura 42 - Cromatograma da amostra INOX (Testemunho) dos compostos voláteis por GC-FID. 87

## Índice de tabelas

Tabela 1 : Fórmulas usadas no cálculo dos índices colorimétricos segundo Sudraud (1958) e Glories (1984)	61
Tabela 2 : Gradiente de eluição utilizado na análise de antocianidinas 3-monoglucosídicas totais	63
Tabela 3 : Resultados obtidos na pesquisa de D-Glucose + D-Fructose ; Ácido L-Málico e ácido Acético por métodos enzimáticos.	86
Tabela 4 : Tempos de retenção de alguns compostos voláteis, que poderão estar presentes nos vinhos.	88
Tabela 5 : Concentração de 4-etilfenol dos ensaios em estudo.	88
Tabela 6: Resumo resultados obtidos relativamente às análises efetuadas.	90

## Lista de símbolos e abreviaturas

- AAB – Acetic acid bacteria (bactéria ácido-acética).
- ACN – Acetonitrilo.
- ACS – Enzima acetil-CoA sintetase.
- ADP – Adenosine diphosphate (difosfato de adenosina).
- AF – Alcoholic fermentation (fermentação alcoólica).
- AGP – Arabinogalactan-protein (proteína-arabinogalactanos).
- ATP – Adenosine-5'-triphosphate (trifosfato de adenosina).
- BSA – Bovine serum albumin (albumina sérica bovina).
- CoA – Coenzima A.
- CS – Citrato sintase.
- D.O.P. – Denominação de Origem Protegida.
- ELMOX – Electrochemical micro-oxygenation (micro-oxigenação electroquímica).
- GC-FID – Gas Chromatography – Flame ionization detector (Cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama).
- GOT - Glutamic oxaloacetic transaminase (aspartate aminotransferase).
- G<sub>6</sub>PDH – Glucose-6-fosfato dehidrogenase.
- HK – Hexoquinase.
- HPLC – High-performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência).
- IC – Intensidade corante.
- ICV- Índice de cor vermelha.
- IFT- Índice de fenóis totais.
- LAB – Lactic acid bacteria (bactéria ácido-lática).
- L-MDH – Enzima L-malato dehidrogenase.
- MLF – Malolatic fermentation (fermentação malolática - bioconversão do ácido málico).
- MO – Micro-oxigenação.
- MP – Manoproteínas.
- NAD<sup>+</sup> - Nicotinamida adenina dinucleótido.
- NADP – Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato.
- PGI – Fosfoglucose isomerase.
- RG-I – ramnogalacturonanas do tipo I.
- RG-II – ramnogalacturonanas do tipo II.
- SO<sub>2</sub> – Dióxido de enxofre.
- TPA – Taninos proantocianínicos totais.
- UV-Vis – ultravioleta-visível.

## Resumo

Os vinhos Portugueses, independentemente da região vitivinícola, resultam maioritariamente de lotes. Portugal tem um elevado património genético – cerca de 250 castas autóctones e uma vasta diversidade de climas e solos, o que torna os nossos vinhos gastronómicos, complexos mas equilibrados, com qualidade consistente e excelente relação qualidade/preço.

Em tempos passados, a grande variedade de castas autóctones resultou em vinhas caracterizadas por uma mistura de castas, por vezes castas brancas com castas tintas. Hoje são denominadas de Vinhas Velhas, daí resultarem vinhos muito apreciados pelos consumidores. Hoje em dia, as vinhas são plantadas em parcelas monovarietais. No entanto, a maioria da produção do vinho de mesa português ainda resulta de lotes, feitos na adega durante a vinificação ou no final da fermentação alcoólica.

Vinhos com maior estrutura, gama mais alta, necessitam de um período de estágio em barricas ou tonéis, ou em condições que permitam uma evolução do vinho semelhante ao que ocorre em madeira. Hoje em dia, existem alternativas ao estágio em madeira, com menores custos, nomeadamente o uso de chips (lascas ou pequenos grânulos de madeira) ou aduelas associado à técnica da micro-oxigenação, por um período a determinar pelo enólogo, consoante o efeito desejado.

Este estudo incidiu sobre a análise do mesmo lote de vinho, resultante de mistura de vinhos do ano de 2012, sujeito a diferentes condições durante o seu estágio - diferentes concentrações de oxigénio durante seis meses, havendo cinco ensaios em estudo. Pretende-se verificar quais as alterações decorrentes deste ensaio, a nível das características físico-químicas, organoléticas e microbiológicas.

É de conhecimento geral que a adição de pequenas quantidades bem conhecidas de oxigénio (micro-oxigenação) durante o estágio e envelhecimento de um vinho altera a sua composição físico-química e sensorial (cor, sabor e aroma), estando essas alterações dependentes da concentração de oxigénio usada, das características iniciais do vinho, do momento de aplicação de oxigénio – antes e/ou após fermentação malolática.

Inicialmente, as análises incidiram sobre a composição fenólica, polissacáridos, pH e análise sensorial dos ensaios. Contudo, com a observação de gás na amostra Inox 1.0 mg/L/mês, realizaram-se outras análises com o intuito de se compreender a sua proveniência, nomeadamente a pesquisa de D-Glucose + D-Fructose, Ácido L-Málico, Ácido Acético e *Dekkera/Brettanomyces*.

Verificou-se que a incorporação de oxigénio após a fermentação malolática, nas concentrações em estudo, não mostraram ser relevantes para ocorrerem alterações

significativas a nível do índice de fenóis totais, concentração de taninos proantociânicos totais, poder tanante, índice de diálise e concentração polissacáridos neste tipo de vinho. No entanto, verificou-se que existem diferenças significativas entre o ensaio lote e os restantes ensaios relativamente à intensidade corante e índice de cor vermelha, tonalidade e % de cor, antocianinas livres totais, antocianinas 3-monoglucósidas livres e pH.

A nível sensorial há também diferenças a assinalar. De facto, verifica-se que o ensaio Inox (Testemunha), sem qualquer adição de oxigénio, devido ao seu meio redutor, apresenta aromas característicos do mesmo – bouquet fechado, aroma reduzido. O ensaio Inox 0,5 mg/L/mês revelou que esta concentração de oxigénio é suficiente para a eliminação dos aromas redutores e abertura do bouquet, assim como uma ligeira sensação de amaciamento de taninos.

Das análises efetuadas aos açúcares redutores, acidez volátil, ácido málico e *Dekkera/Brettanomyces*, conclui-se que se trata de um vinho seco, com acidez volátil controlada para todos os ensaios, com a total degradação do ácido málico e sem qualquer problema associado à presença de *Dekkera/Brettanomyces*. A presença de gás poderá estar então associada à degradação do ácido cítrico pelas bactérias ácido-láticas, atribuindo um carácter ligeiramente amanteigado ao ensaio 1,0 mg/L/mês de oxigénio durante seis meses.

## Abstract

Micro-oxygenation is the process of deliberately introducing minute, measured amounts of oxygen into wines, with the aim of bringing about desirable changes in colour, aroma, texture and, also, the ability to mimic the reactions that occur during wine oak-ageing. It involves the use of specialized equipment to regulate the doses of oxygen that are administered. It is generally known that the addition of oxygen in wines during the stage and aging changes its physical, chemical and organoleptic (taste, color and aroma) composition. Those changes are dependent of the oxygen concentration used, the initial wine characteristics and the time of oxygen application - before and/or after malolactic fermentation.

The effect of micro-oxygenation on the composition of a Douro red wine was investigated, where oxygen was applied at different concentrations (0,5 mg/L/month; 1,0 mg/L/month; 1,0 mg/L/month + 0,5 mg/L/month + staves) for six months. A control with no oxygen was also included as the final blend that goes to the market too.

Initially, the analyses were focused on the phenolic composition, polysaccharides, pH and sensory analysis. However, with the observation of gas in the MO sample 1.0 mg/L/month, other analyses were done in order to understand its origin, including D-Glucose + D-Fructose, L-Malic Acid, acetic acid and *Dekkera/Brettanomyces*.

Micro-oxygenation, as applied in this study, did not show any significant effect on the total phenols content, tannin capacity to complex with BSA, dialysis index and polysaccharides content in the study wine. However, it was found that there were significant differences between the final blend test and other tests regarding the colour intensity, red color rate, hue and % colour, free anthocyanins content and pH.

Sensory analysis were done, there are also differences to report. In fact, it appears that the control test with no oxygen, due to its reducing environment, it has the same characteristic aromas – closed bouquet, reduced aromas. The test with 0.5 mg / L / month revealed that this oxygen concentration is sufficient to remove off-flavors, opening the bouquet and a sense of slight softening tannins.

About analyzes of reducing sugars, volatile acidity, malic acid and *Dekkera / Brettanomyce*, it shows that it is a dry wine with volatile acidity under control for all tests, with a total degradation of malic acid and without any problem associated with presence of *Dekkera / Brettanomyces*. The presence of gas can then be associated with the degradation of citric acid by lactic acid bacteria, attributing a slightly buttery character to the test 1.0 mg / L / month oxygen for six months.

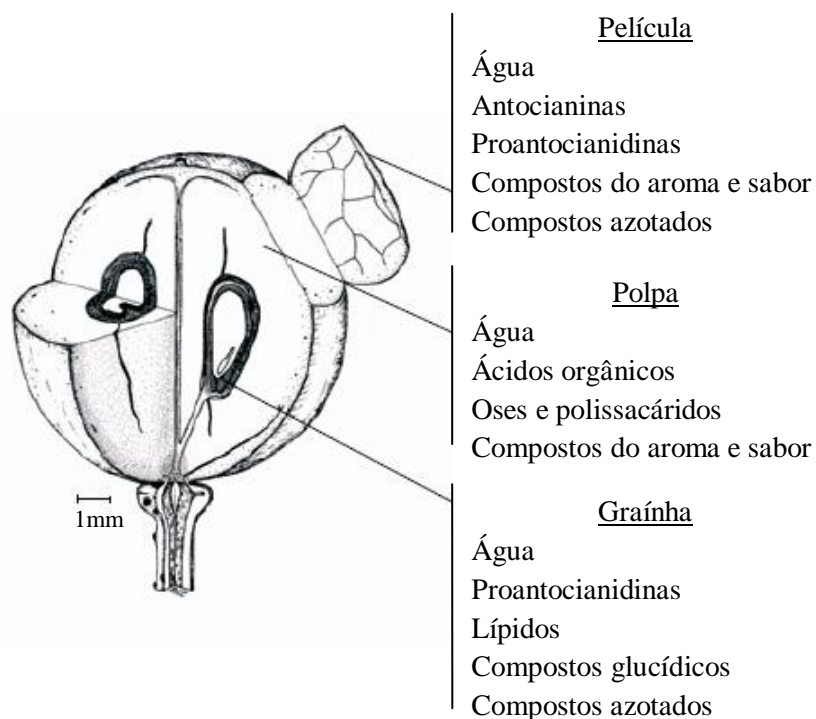
# Introdução

## 1. Cor, sabor e aroma dos vinhos

A essência da atração pelo vinho, está na imensa diversidade relativamente a cor, sabor e aroma que diferentes castas e origens geográficas proporcionam.

Boas maturações, que correspondem a níveis de açúcar, acidez, cor da película, taninos e sabor ideais para o tipo de vinho que se pretende fazer, bom estado sanitário da matéria-prima, assim como as técnicas de vinificação usadas e a estabilização e conservação dos vinhos são fatores determinantes para a obtenção de vinhos de qualidade, com características organolépticas únicas e apreciadas pelo consumidor. Há que distinguir gosto pessoal, de padrões de qualidade segundo critérios mais ou menos aceites, ambos importam (Schuster 2000).

Os compostos responsáveis pelas características sensoriais dos vinhos, estão distribuídos pelas diferentes partes da uva, como demonstra a figura 1.



**Figura 1-** Localização dos diferentes compostos nas diferentes partes da uva (adaptado Coombe 1987).



A cor do vinho tinto é o primeiro parâmetro de qualidade a ser apreciado pelo consumidor e determina a sua avaliação sensorial a uma extensão significativa. De um modo geral, é a primeira característica a ser observada e desta forma tem um papel crucial na tomada de decisão do consumidor, que geralmente tem preferência por vinhos de cor bem acentuada.

As antocianinas são os pigmentos responsáveis pela cor vermelha dos vinhos tintos, que são transferidas das películas para o mosto durante a maceração pelicular durante a vinificação. A cor vermelho vivo dos vinhos jovens, deve-se maioritariamente à presença de antocianinas livres, à sua auto-associação e à ocorrência de copigmentação das antocianinas com outros fenóis presentes no vinho, tais como flavanóis, flavonóis e ácidos hidroxicinâmicos (Haslam 1980). Contudo, durante o estágio e envelhecimento, as antocianinas participam em numerosas reações de condensação, resultando na formação de novos pigmentos oligoméricos e poliméricos, de estrutura mais estável, apresentando tons de vermelho-alaranjado, traduzindo-se numa alteração de cor perceptível no vinho (Somers 1971, Robinson et al. 1996, Boulton 2001, Hermosín et al. 2005).

A composição fenólica é um aspeto importante em vinhos tintos de gama mais elevada. Os fenóis são responsáveis pela adstringência e amargor (Fischer e Noble 1994) e desempenham um papel importante na estabilidade da cor (Robinson et al. 1966).

Os monómeros flavon-3-ol são amargos e assim têm sabor. As proantocianidinas (taninos condensados) são adstringentes e devido a esta perceção, algumas discussões ainda estão em aberto.

Taninos são compostos cuja função na célula se deve à proteção ao ataque de herbívoros e de fungos. Este facto deve-se à capacidade dos taninos se ligarem fortemente a proteínas (Haslam 1998). Em geral, é considerado que ocorre a perda de lubrificação da boca, devido à agregação dos taninos com as proteínas salivares e sua precipitação. A adstringência é uma sensação tátil, ou seja, pode-se senti-la – paladar (Noble 1994, Gawel 1998).

Além de adstringentes, os taninos poderão ser amargos, é uma sensação gustativa e é atribuída à presença de taninos de mais baixo peso molecular (Arnold et al. 1980, Robichaud e Noble 1990, Kallithraka et al. 1997). Não é desejável muito amargor no vinho e este está associado à falta de maturação das uvas.

Para alguns investigadores, é claro que a perceção de adstringência no vinho pode ser influenciada pela presença de outros componentes, nomeadamente o etanol (Fischer e Noble 1994), acidez (Fisher e Noble 1994, Peleg et al. 1998), viscosidade (Smith et al. 1996), açúcares simples (Boselli et al. 2004), polissacáridos (Riou et al. 2001, Vidal et al. 2004b) e antocianinas (Vidal et al. 2004b). É difícil transmitir o quão complexos são estes

estudos devido às variações de resposta humana à adstringência e amargor (Fischer et al. 1994). Além disso, as interações complexas entre taninos e outras macromoléculas encontradas no vinho demonstram ser um desafio na área da investigação para a sua total compreensão (Saucier et al. 1997a-b, Roiu et al. 2001, De Freitas et al. 2003).

Do ponto de vista enológico, o principal objetivo num vinho tinto seco é obter o equilíbrio dos seus principais constituintes – álcool, acidez, taninos e sabor – na forma como se inter-relacionam (Schuster 2000).

Relativamente às características aromáticas, um certo número de compostos voláteis parece ser comum a todas as castas e aos seus vinhos, com algumas flutuações consideráveis entre castas (Dubois 1994).

Os compostos voláteis no vinho podem ter diferentes origens :

- bago da uva;
- compostos voláteis provenientes da uva e resultantes de precursores de compostos não voláteis libertados;
- metabolismo de leveduras e bactérias;
- extração de compostos da madeira;
- reações químicas após estágio (Francis e Newton 2005).

Os aromas num vinho podem ser classificados da seguinte forma:

- aromas primários ou pré-fermentativos (casta): certos aromas têm origem em uvas de determinadas castas tais como pimento verde, violeta, rosa e alguns menos agradáveis como tabaco, querosene, buxo, urina de gato;
- aromas secundários ou fermentativos (fermentação): a presença de aromas desagradáveis poderão ser formados durante a fermentação alcoólica (fermento, compostos de enxofre);
- aromas terciários ou pós-fermentativos (estágio e envelhecimento): compostos indesejáveis poderão formar-se devido a condições oxidativas ou desenvolvimento de microorganismos durante o estágio e envelhecimento em cubas, barricas e/ou garrafa (maçã alterada, couve cozida, couro, compostos de enxofre, amanteigado, medicinal, entre outros).

Para vinhos de grande qualidade, um importante pré-requisito a nível comercial e marketing é a ausência de imperfeições. Defeitos no vinho, diminui a apreciação do aroma e sabor (Rapp, A. ).

O lote de vinhos (*blend/assemblage*) é frequentemente usado, com a finalidade de equilibrar a composição dos vinhos, para aumentar a sua estabilidade, para standardizar um produto com características sensoriais particulares, e/ou ir ao encontro de uma cor

específica para o produto a colocar no mercado. Assim, é possível alcançar o máximo de qualidades na mistura obtida, assim como encobrir algumas lacunas ou defeitos de um vinho, pela compensação das excelentes qualidades de um outro usado no lote. Desta forma, é de grande interesse para o enólogo calcular as proporções ideais de cada componente do lote. Um outro objetivo do lote, poderá ser apenas de interesse económico, isto é, otimizar o uso de algumas castas e os custos de produção (Rankine 1988, Boulton et al. 1996).

## **2. Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal. São definidos como substâncias que possuem um anel aromático, com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Entre as frutas, a uva é uma das maiores fontes de compostos fenólicos.

A composição fenólica das uvas depende da espécie (Singleton e Esau 1969), da variedade (Etievant et al. 1988), das condições climáticas relativamente às temperaturas diárias e exposição solar, condições do solo (Jackson e Lombard 1993), assim como as práticas culturais realizadas na vinha, antes e no decorrer da maturação das uvas, vão também condicionar os teores de fenóis presentes. Assim, alguns trabalhos referem as adubações (Lepadatu et al. 1972, Morris et al. 1983), a forma de condução da vinha (Carbonneau 1991) e ainda a própria prática da desfolha (Ribéreau-Gayon 1990) como fatores determinantes.

Vários parâmetros influenciam a composição fenólica dos vinhos, nomeadamente a composição fenólica das uvas aquando a vindima, a extensão da extração dos compostos fenólicos durante a vinificação e a contribuição dos compostos fenólicos resultantes do contato com a madeira. A composição fenólica do vinho contribui para as suas qualidades sensoriais tais como cor, sabor, adstringência e amargor, assim como o seu potencial anti-oxidante (Soleas et al. 1997a).

Uma possível forma de caracterizar os polifenóis presentes nas uvas e nos vinhos é a sua divisão em compostos flavonóides e compostos não-flavonóides.

Entre os compostos flavonóides encontram-se as antocianinas, flavonas, flavan-3-óis, flavonóis e os flavanonóis. Nos compostos não-flavonóides encontram-se os ácidos fenólicos (benzóicos e cinâmicos) e os estilbenos.

## **2.1. Compostos fenólicos nos vinhos: substratos para oxidação**

Os compostos fenólicos são os principais substratos dos mostos e vinhos a serem oxidados. É a sua reatividade e diversidade que faz com que intervenham em numerosas reações bioquímicas, desempenhando as funções de substratos, oxidantes, catalizadores ou mesmo inibidores. Estes substratos e os produtos de reação são os constituintes responsáveis pelas características dos diferentes vinhos (Zoecklein et al. 1995, Allen 1998). Eles são responsáveis por todas as diferenças entre vinhos branco e tinto.

A reatividade dos compostos fenólicos é afetada por diversos fatores, tais como a temperatura, pH, concentração de SO<sub>2</sub> livre (Rivas-Gonzalo et al. 1995, Ribéreau-Gayon et al. 2000) contudo é a exposição ao oxigénio o fator mais determinante (Singleton 1987, Danilewicz 1987, Atanasova et al. 2002).

Estes compostos possuem propriedades bacteriológicas, anti-oxidantes e vitamínicas, protegendo os consumidores de doenças cardiovasculares.

## **2.2. Compostos flavonóides**

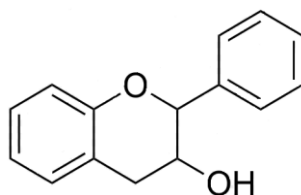
Dentro da classe dos compostos fenólicos, os flavonóides são os principais responsáveis pelas sensações gustativas dos vinhos (flavan-3-óis) e pela sua cor (antocianinas), assumindo ainda um importante papel no envelhecimento dos vinhos (Jordão 1999).

Compostos flavonóides são potentes anti-oxidantes, capturadores de radicais livres e quelantes de metais.

### **2.2.1. Flavanóis**

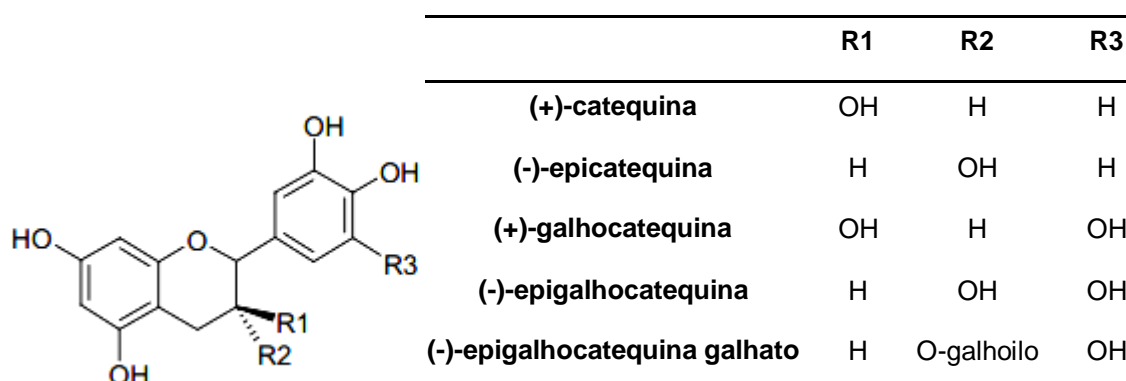
Flavan-3-óis são encontrados no vinho, chá, fruta e chocolate (Arts et al. 2000a-b). Esta classe de compostos difere de outros flavonóides, uma vez que eles não ocorrem como glucósidos (Macheix et al. 1990). Flavan-3-óis são encontrados em maior quantidade em vinhos tintos do que em vinhos brancos devido à sua extração das gráíñas e películas durante a vinificação.

Os flavan-3-óis são constituídos por um núcleo flavânico que é composto por dois anéis aromáticos e por um anel heterocíclico pirânico (figura 2).



**Figura 2** - Estrutura geral dos flavan-3-óis (adaptado de Garrido e Borges 2013).

Os compostos mais simples da família dos flavan-3-óis são as catequinas e as galhocatequinas (figura 3).



**Figura 3** - Estrutura dos flavan-3-óis mais abundantes no vinho.

Outros derivados da catequina, nomeadamente epicatequina galhato e epigalhocatequina galhato, têm sido identificados nas uvas e vinhos (Decendit et al. 2002, Mattivi et al. 2009).

A importância desta classe de compostos reside também no facto de serem a unidade estrutural constituinte das procianidinas (vulgarmente denominadas de taninos) muito abundantes na natureza.

Como referido anteriormente, uma das principais características dos taninos é a sua capacidade para complexar e precipitar proteínas. Esta propriedade acarreta atributos positivos e negativos. Por um lado, é aceite que a interação dos taninos com as proteínas

salivares está na origem da sensação de adstringência, que pode ser numa certa medida, atributo positivo da qualidade de certas bebidas, como o vinho tinto, cerveja e chá. A adstringência traduz-se numa sensação equilibrada de secura e aspereza percebida na cavidade oral aquando da ingestão de certos alimentos (Mcrae e Kennedy 2011).

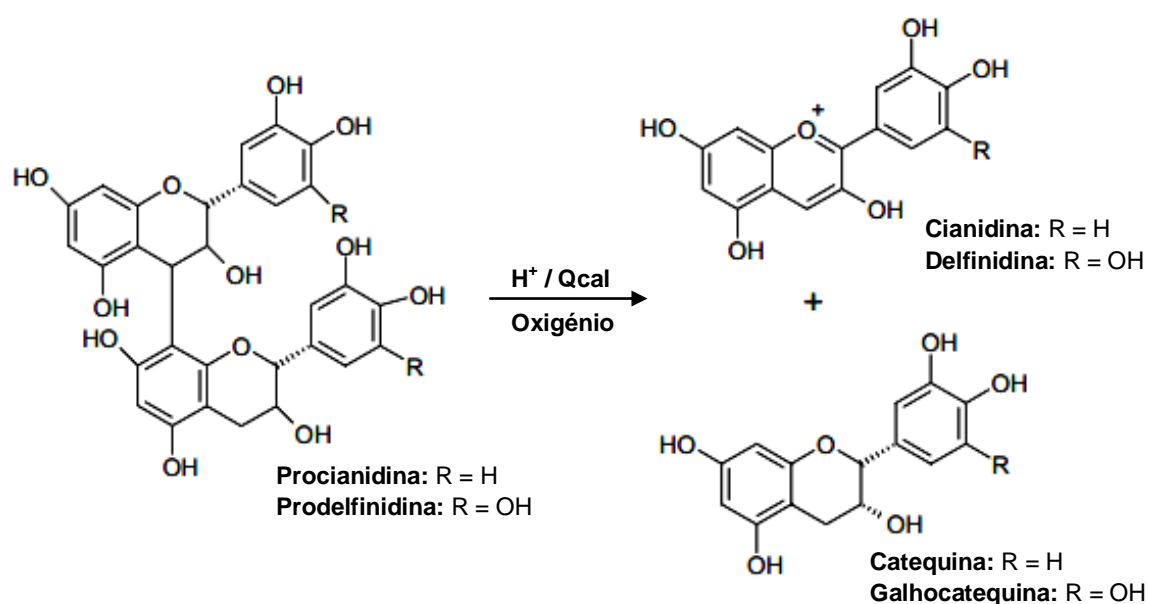
Classicamente, os taninos são divididos em dois grandes grupos: os taninos condensados (proantocianidinas), que são oligómeros de catequinas ligados por ligações C-C; e os taninos hidrolisáveis, que são ésteres de monossacáridos com ácido gálgico ou oligómeros de ácido gálgico/elágico.

Apesar de existirem estes 2 grupos, só os taninos condensados ocorrem realmente nas uvas e nos seus derivados. No caso das uvas, os principais elementos são as formas monoméricas de (+)-catequina e (-)-epicatequina e ainda os oligómeros e polímeros formados a partir das formas monoméricas através do estabelecimento de ligações C4-C8" ou C4-C6" (Bourzeix et al. 1986, Ricardo da Silva et al. 1991 b, Cheynier et al. 1992, Prieur et al. 1994, Souquet et al. 1996). Estas estruturas presentes nas uvas e vinhos podem ainda encontrar-se associadas a ácidos, como seja o ácido gálgico, normalmente ao nível do C3 (Lee e Jaworski 1989, Ricardo da Silva et al. 1991 b).

As proantocianidinas presentes nas uvas encontram-se de uma forma geral na forma polimerizada (Haslam 1980, Sun et al. 1996, Jordão 1999).

As proantocianidinas decompõem-se por aquecimento em meio-ácido, originando antocianidinas (cianidina e delfinidina), mediante a rutura das ligações entre as unidades monoméricas, de acordo com o mecanismo descritos por Bate-Smith (figura 4) (Ricardo Da Silva 1995). Assim, de acordo com a natureza da unidade fundamental, as proantocianidinas podem dividir-se em dois sub-grupos: as procianidinas – polímeros da catequina; as prodelfinidinas – polímeros da galhocatequina.

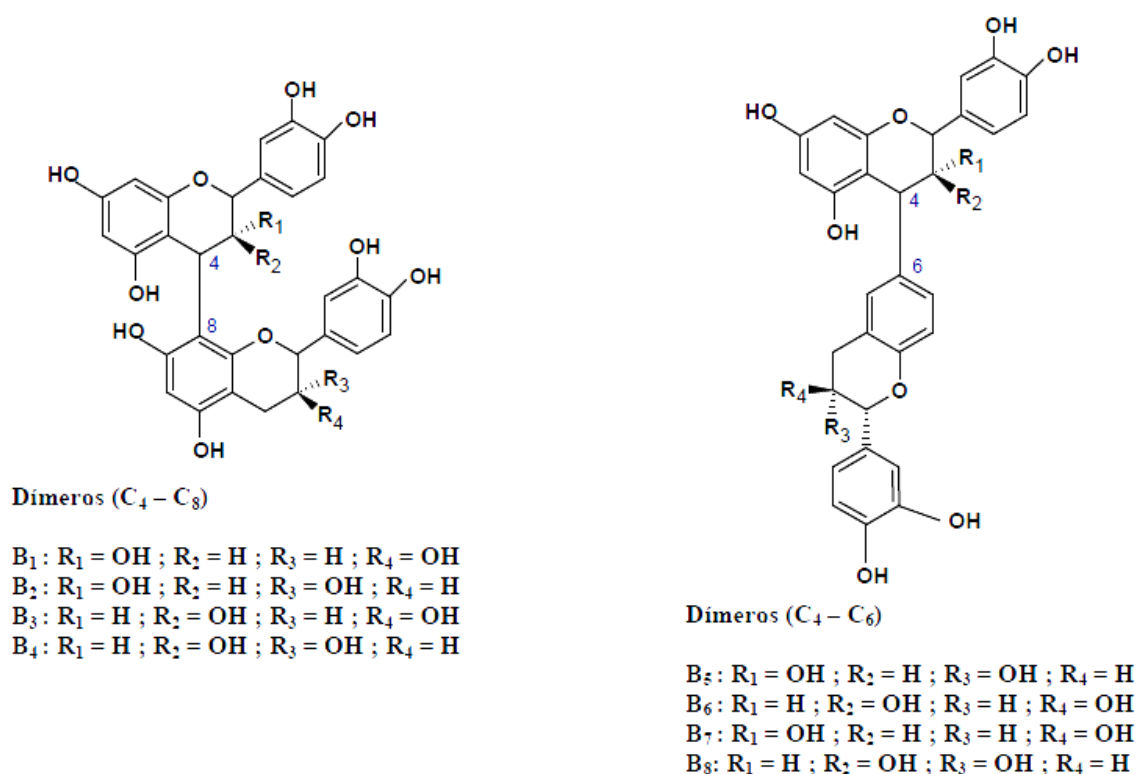
Nas gráinhas apenas são detetadas procianidinas (livres ou esterificadas com uma ou mais moléculas de ácido gálgico) enquanto que nas películas, para além das procianidinas, estas contêm prodelfinidinas (Escribano-Bailón et al. 1995).



**Figura 4** - Decomposição das proantocianidinas por aquecimento em meio ácido (reação de Bate-Smith) (adaptado de Bate Smith 1954).

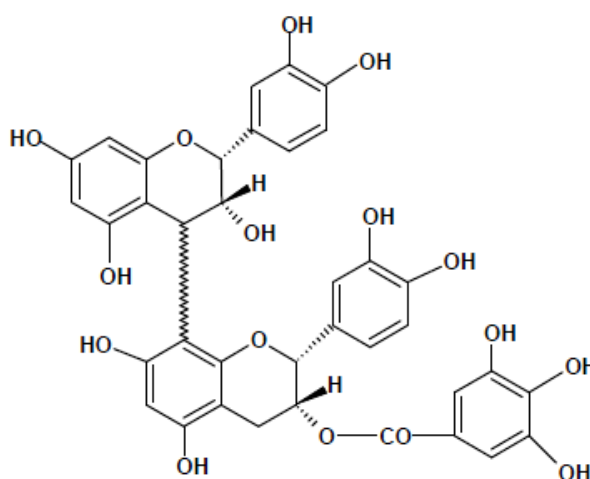
Tendo como unidade monomérica fundamental o flavan-3-ol, as proantocianidinas podem ser diméricas, oligoméricas ou poliméricas. O tipo de ligação estabelecida (ligação interflavanólica) define procianidinas diméricas e triméricas através de uma letra (A, B, C ou D). O isómero correspondente é indicado por um algarismo.

Assim, as procianidinas diméricas do tipo B resultam da condensação de duas unidades flavanólicas através de uma ligação entre C4 da unidade superior e C6 ou C8 da unidade inferior (figura 5).



**Figura 5** - Estruturas das procianidinas diméricas do tipo B.

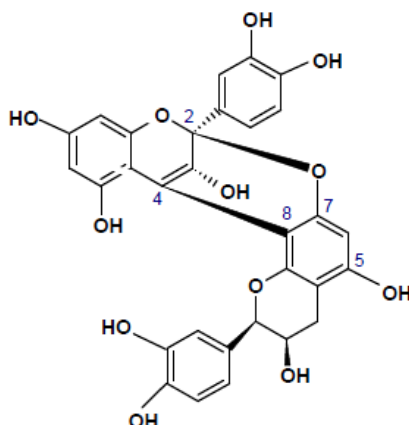
O dímero B<sub>2</sub>, constituído por duas unidades de (-)-epicatequina, pode encontrar-se esterificado com o ácido gálico em C3 do anel C da unidade monomérica inferior (figura 6).



**Figura 6** - Estrutura do dímero B<sub>2</sub>-3''-O-galato.



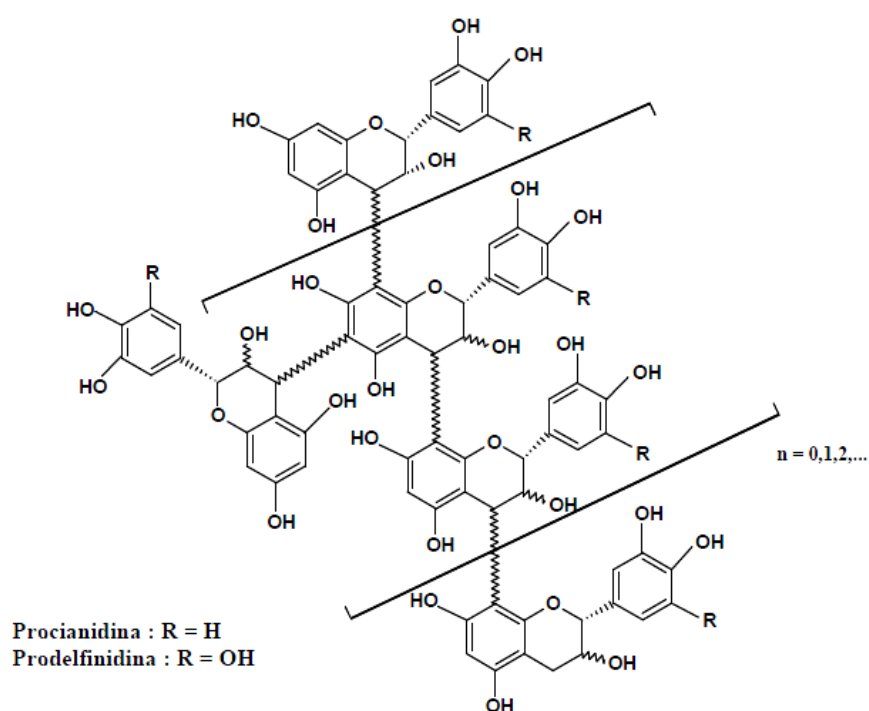
As procianidinas diméricas do tipo A, para além de apresentarem a ligação interflavanólica acima referida (tipo B), possui ainda uma ligação éter entre o grupo hidroxilo de C5 ou C7 da unidade inferior e o C2 da unidade superior (Salagoity-Auguste e Bertrand 1984) (figura 7).



**Figura 7** - Estrutura da procianidina dimérica do tipo A.

As procianidinas triméricas podem ser divididas em tipo C: com ligações interflavanólicas do tipo B; e em tipo D: com ligações interflavanólicas do tipo A e do tipo B.

Na natureza, as proantocianidinas encontram-se maioritariamente em misturas de polímeros de diferentes graus de polimerização (figura 8) (Haslam 1996).



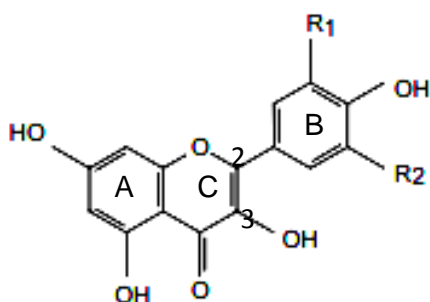
**Figura 8** - Esquema geral das proantocianidinas polimerizadas.

Entre castas há diferenças nos teores de procianidinas. No entanto, o seu perfil mantém-se relativamente homogêneo. Nas películas, a procianidina B1 é normalmente mais abundante, enquanto que nas grânhas é a procianidina B2 (Ricardo Da Silva 1995). Nos vinhos, a procianidina B1 é a mais abundante (Dallas et al. 1995).

### 2.2.2. Flavonóis

Flavonóis poderão ser encontrados em fruta e vegetais, assim como em bebidas tais como vinho e chá (Hollman e Arts 2000). Surgem normalmente como glucósidos com uma ligação ao açúcar preferencialmente na posição 3. Sendo a glucose o principal açúcar formado, os glucósidos poderão compreender galactose, rhamnose, arabinose e xilose. Na figura 9, encontram-se representadas as agliconas dos flavonóis mais importantes: quempferol, quercetina e miricetina. Estes heterósidos das uvas são facilmente hidrolisáveis e nos vinhos tintos encontram-se as agliconas no estado livre (Ribéreau-Gayon et al. 1972).

Embora sejam uma família minoritária nas uvas, podem ter um papel importante na evolução da cor dos vinhos tintos através de processos de copigmentação com as antocianinas. Os flavonóis possuem uma cor amarela, no entanto não são considerados muito importantes para a cor dos vinhos brancos (Allen 1994).



Flavonóis	R1	R2
Quempferol	H	H
Quercetina	OH	H
Miricetina	OH	OH

Figura 9 - Estrutura dos flavonóis (adaptado de Oliveira et al. 2011).

### 2.2.3. Pigmentos antociânicos

Durante os últimos anos, numerosas famílias de derivados de antocianinas têm sido encontradas em uvas, vinhos e soluções modelo de vinho. Os pigmentos antociânicos têm uma estrutura baseada no catião flavílio (figura 10).

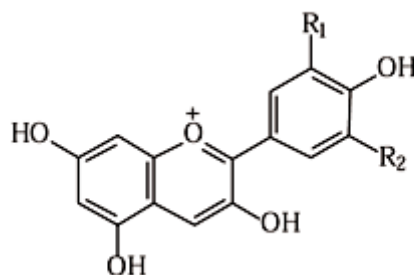
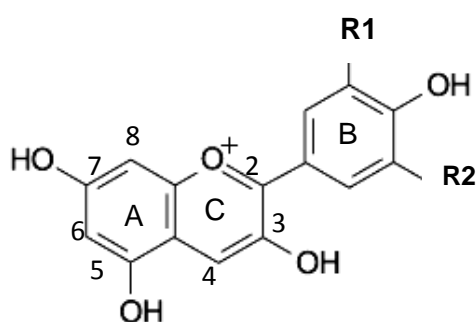


Figura 10 - Catião flavílio.

Os pigmentos antociânicos são responsáveis pela cor das uvas e do vinho, uma característica que é determinada pela sua estrutura química, denominada grau de hidroxilação, metilação e/ou glicosilação (He et al. 2010). Nas castas e vinhos tintos, cinco antocianidinas têm sido identificadas: cianidina (vermelho alaranjado), peonidina (vermelho), delphinidina (vermelho azulado), petunidina e malvidina (vermelho azulado) - figura 11, (Koponen et al. 2007, He et al. 2010). A malvidina é considerada o composto mais representativo em variedades *Vitis vinífera* (Castillo-Muñoz et al. 2010).

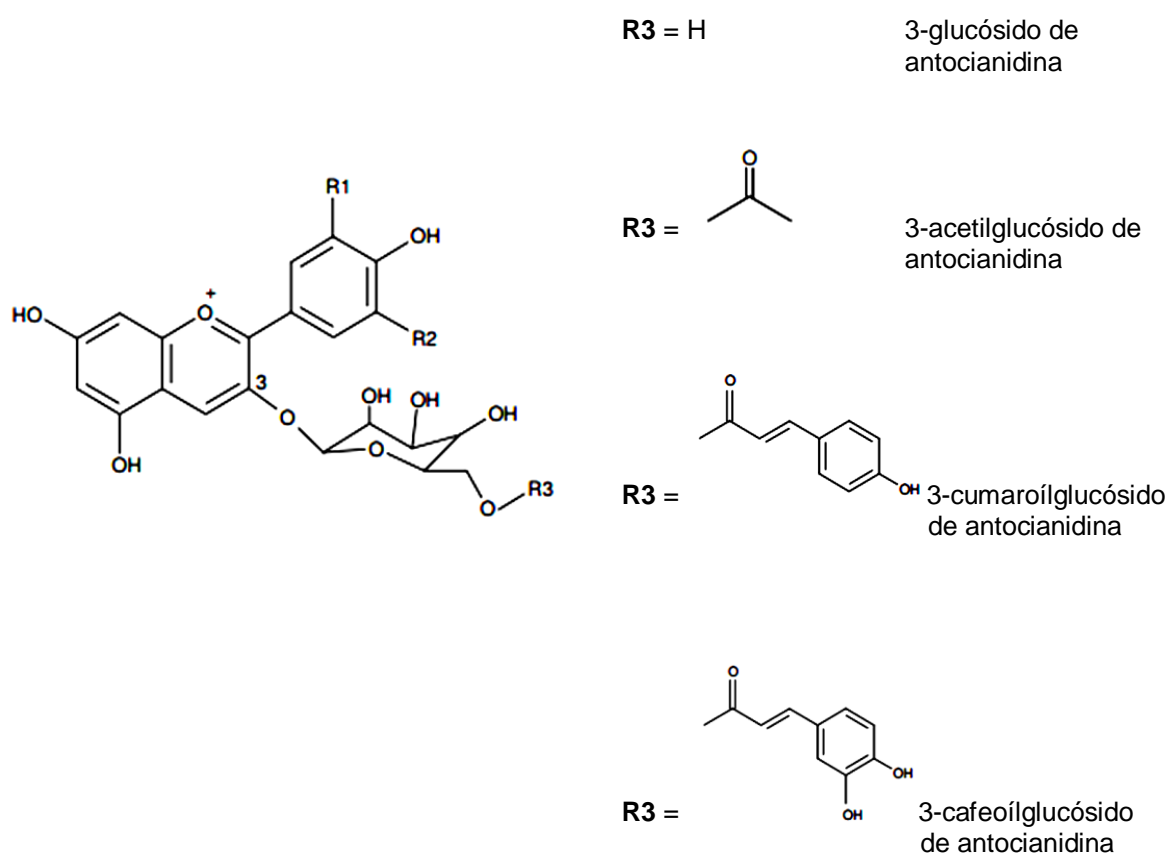


Antocianidina	R1	R2
Delfinidina	OH	OH
Cianidina	OH	H
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Figura 11 - Estruturas das antocianidinas correspondentes para os diferentes substituintes (adaptado Oliveira et al. 2011).

Quimicamente, as antocianinas são antocianidinas glicosídicas correspondendo à antocianidina aglicona obtida por hidrólise.

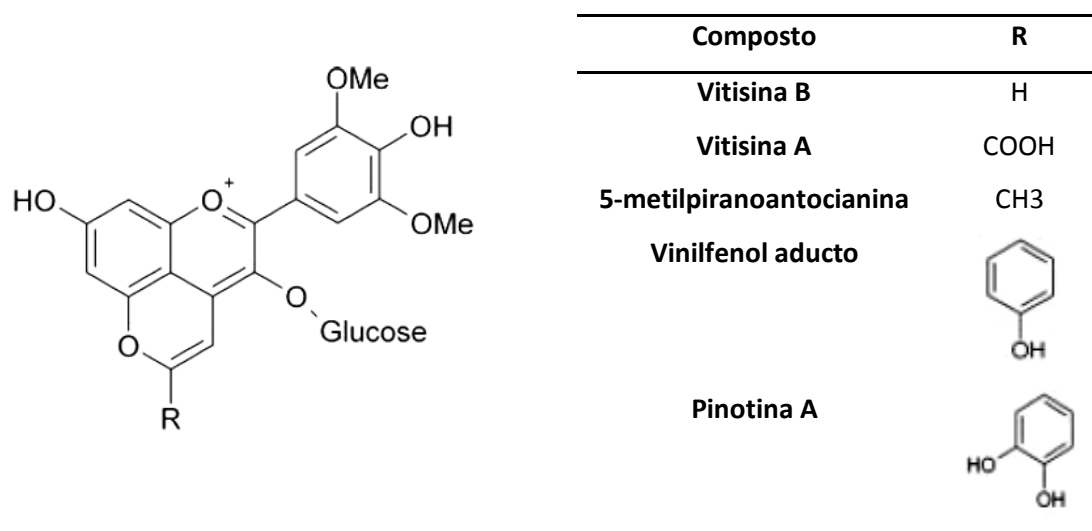
Na espécie *Vitis vinifera* a glicosilação ocorre em O-3 (em outras espécies *Vitis* podem ocorrer também em O-5) (Ribéreau-Gayon 1982), podendo encontrar-se esterificados em C6 com alguns ácidos, nomeadamente o ácido acético, o ácido cumárico e o ácido cafeico (figura 12).



**Figura 12** - Estrutura das antocianidinas 3-monoglucosídicas e respectivos ésteres acilados.

O 3-glucósido de malvidina é a antocianina mais abundante nos vinhos, embora existam vinhos que predominem outras antocianinas (Jackson 2008).

Um grupo importante pertencente às piranoantocianinas, foi descrito pela primeira vez em 1997 por Bakker e Timberlake, que isolaram o composto chamado Vitisina A. Eles assumiram que este é produto da reação entre 3-glucósido de malvidina e uma molécula desconhecida, a qual está ausente em uvas frescas mas presente em vinhos envelhecidos (Rentzsch et al. 2007). Estudos demonstram que as reações de cicloadição entre antocianinas e outras pequenas moléculas podem formar uma nova família de pigmentos derivados de antocianinas denominados piranoantocianinas. Especificamente, a reação com ácido pirúvico produzido pelas leveduras durante a AF ou acetaldeído originam Vitisinas do tipo A e B, respetivamente (Bakker e Timberlake 1997, Fulcrand et al. 1998; Vivar-Quintana et al. 1999, Mateus et al. 2001). Além do mais, a reação entre antocianinas e vinilfenol pode gerar aductos vinilfenol (Fulcrand et al. 1996, Schwarz et al. 2003) e finalmente, os compostos previamente formados pelas pontes etilideno podem dissociar e também gerar aductos vinilfenol (figura 13 ).



**Figura 13** - Estrutura das piranoantocianinas mais comuns no vinho (adaptado de Rentzsch et al. 2007).

Vitisinas do tipo A ou carboxipiranoantocianinas, são os compostos derivados de antocianinas mais importantes detetados em vinhos tintos (Vinhos do Porto) após um ano de envelhecimento (Mateus e De Freitas 2001).

Vitisinas do tipo B são as piranoantocianinas mais simples encontradas em vinhos tintos (Bakker e Timberlake 1997).

Todas estas reações resultam numa mudança gradual da cor do vinho inicial vermelho-púrpura a vermelho-acastanhado. A adstringência também diminui, mas o mecanismo desta ocorrência não é claro. Teoricamente, a formação de pontes etil deverá aumentar o grau de polimerização dos flavanóis, o que se deverá traduzir num aumento da adstringência (Vidal et al. 2003). Contudo, a adstringência diminui com o envelhecimento e

este facto tem sido atribuído à reação dos compostos fenólicos com o oxigénio. Uma possível explicação poderá ser que as reações de condensação entre antocianinas e flavanóis podem diminuir a adstringência (Vidal et al. 2004).

### 2.2.3.1. Influência do pH na cor das antocianinas

Em solução aquosa, as antocianinas presentes estão em equilíbrio em diferentes formas. Estes compostos têm sido vastamente estudados e descritos na literatura (Brouillard e Lang, 1990, Santos et al. 1993, Pina et al. 1996, Pina et al. 1997, Redus et al. 1999, Asenstorfer et al. 2003, Jordheim et al. 2006, Dougall e Baker 2008, Freitas et al. 2011, Mora-Soumille et al. 2013). Em soluções aquosas muito ácidas (pH<1) esses pigmentos encontram-se essencialmente na forma de catião flavílio de cor vermelha. Um aumento do pH provoca a redução da intensidade corante devido à diminuição da concentração do catião flavílio, que é convertido à forma hemiacetal pelo ataque nucleofílico da água. Seguidamente, o hemiacetal sofre uma reação de tautomerização, originando a cis-chalcona (amarelo pálido), que isomeriza para trans-chalcona. A valores de pH neutros e básicos, ocorre a desprotonação do catião flavílio, originando as formas quinoidais azul/violeta como representado na figura 14 (Brouillard 1982).

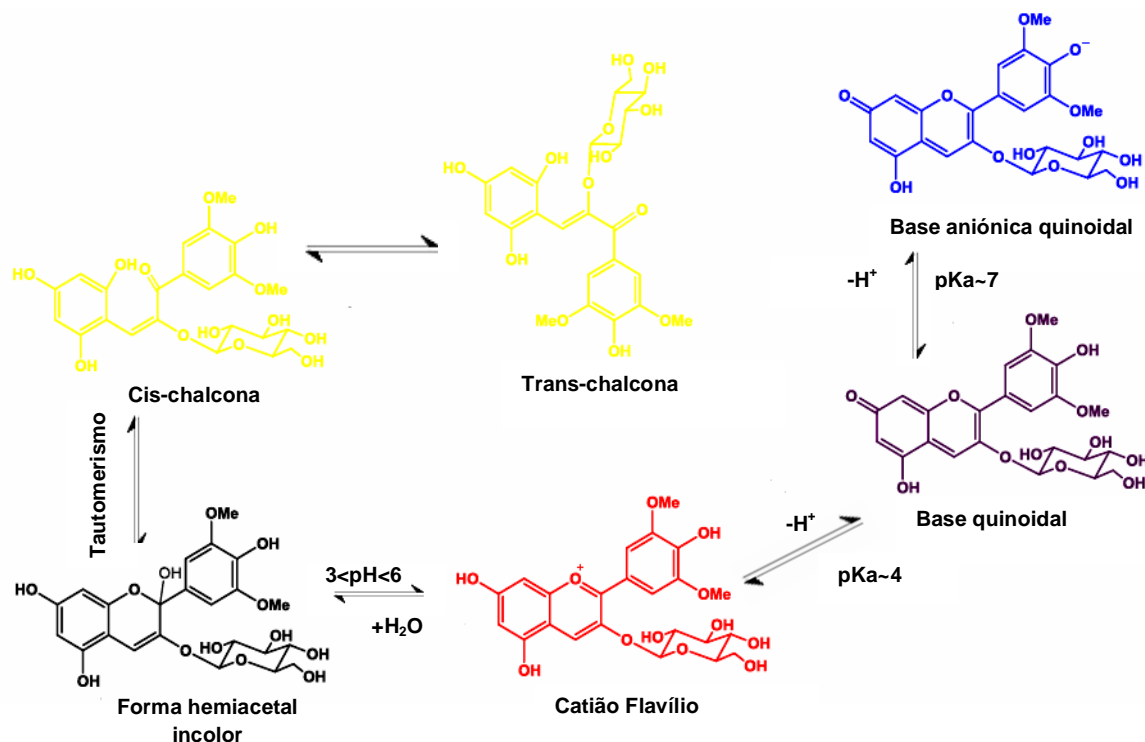


Figura 14 - Equilíbrio das antocianinas em meio aquoso a diferentes valores de pH (adaptado Oliveira et al. 2014).

As quantidades relativas de catião flavílio, formas quinoidais, pseudo-base e chalcona nas condições de equilíbrio variam conforme o pH e a estrutura da antocianina (Iacobucci e Sweeny 1983).

### 2.2.3.2. Reação das antocianinas com o bissulfito

O  $\text{SO}_2$  é largamente utilizado na produção de vinhos, atuando com anti-oxidásico, anti-oxidante e como inibidor do crescimento de agentes microbiológicos indesejáveis. Se este for adicionado antes da fermentação, ajuda na clarificação dos mostos de uvas brancas, aumenta a extração da cor das películas de mostos de uvas tintas e estabiliza a cor quando adicionado durante o engarrafamento. No entanto, o seu efeito é conseguido à custa de uma reação reversível de descoloração das antocianinas monoméricas devido à formação de compostos estáveis e incolores (Jurd 1964, Timberlake e Bridle 1967).

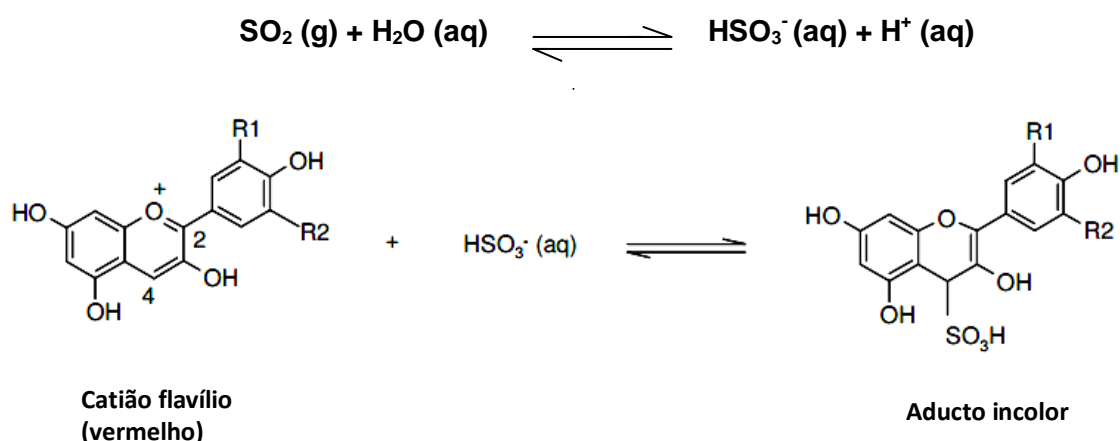


Figura 15 - Equação química que traduz a reação do bissulfito com as antocianinas.

O  $\text{SO}_2$  promove a descoloração da antocianina, por sua adição na posição 2 ou 4. A cor, entretanto, pode ser regenerada por acidificação e aquecimento do produto para promover a formação de dióxido de enxofre que se liberta na forma de gás. Contudo, altas concentrações de sulfito (>10 gramas/Kg) provoca a destruição irreversível das antocianinas para chalconas.

### **2.2.3.3. *Reação das antocianinas com os taninos***

Durante o processo de vinificação e envelhecimento, a cor vermelho-púrpura que os vinhos jovens apresentam, altera-se para uma cor vermelho-alaranjado (Rivas et al. 2005). Esta alteração deve-se à conversão das antocianinas por condensação com outros compostos fenólicos. Estes novos pigmentos constituem um grupo heterogéneo de moléculas, cuja formação é explicada por diversos mecanismos. Um deles é a condensação das antocianinas com os flavanóis através de uma ponte de etilo mediada pelo acetaldeído (Timberlake 1976, Escribano-Bailón et al 1996). Estes pigmentos, cuja presença tem vindo a ser demonstrada nos vinhos (Vivar-Quintana et al. 1999, Mateus et al 2002), são relativamente instáveis, no entanto são menos sensíveis que as antocianinas à descoloração pelo SO<sub>2</sub> e pelo aumento do pH (Escribano-Bailón et al. 2001).

### **2.2.3.4. *Reação da antocianinas com os metais (metaloantocianinas)***

As antocianinas que possuem um sistema orto-dihidroxiado no anel B, tais como a cianidina, delfinidina e petunidina, complexam-se com cobre, ferro, alumínio, estanho e magnésio (Yoshida et al. 2003). Estes produtos, em relação às antocianinas livres, principalmente no caso do alumínio, apresentam maior estabilidade frente a fatores como calor, pH, luz e oxigénio.

### **2.2.3.5. *Copigmentação***

A copigmentação consiste numa interação molecular por ligações de hidrogénio e interações hidrofóbicas entre as antocianinas e outras moléculas (não coradas) que atuam como copigmentos (Davis et al. 1993). Estes complexos volumosos modificam a ressonância do catião e previnem a hidratação nos carbonos 2 e 4 (Mazza e Brouillard 1987), impedindo o aparecimento da forma incolor hemiacetal.

Além do pH, temperatura, estrutura e concentração das antocianinas e concentração de copigmentos, as interações moleculares das antocianinas com outros compostos afetam a sua estabilidade, contribuindo assim para a grande variedade de cores que estes pigmentos exibem (Heredia et al. 1998).



A copigmentação tem uma elevada importância para a compreensão da relação entre a composição das uvas e a cor dos vinhos, a variação na cor e na concentração de pigmentos entre vinhos e em todas as reações envolvendo antocianinas durante o envelhecimento dos vinhos. É já aceite que a copigmentação seja responsável por 30 a 50% da cor dos vinhos jovens, que é principalmente influenciada pelos níveis de vários compostos fenólicos (Boulton 2001).

O ião flavílio é uma estrutura carregada positivamente ( $A^+$ ), estabelecendo assim ligações com outros compostos fenólicos presentes no vinho, de diferentes cargas parciais, ocorrendo portanto o fenómeno de copigmentação (Watherhouse 2002).

O fenómeno de copigmentação baseia-se em dois efeitos:

-a formação do complexo de transferência  $\pi$ -  $\pi$  que causa alteração na forma do ião flavílio e nas suas propriedades espectrais, aumentando a absorção de radiação (Watherhouse 2002);

-a estabilização do ião flavílio, através do complexo de transferência que favorece o seu equilíbrio devido ao aumento da carga, tornando as antocianinas mais estáveis e consequentemente mais duradoura a sua cor vermelha (Watherhouse 2002).

O pH do meio é um fator condicionante deste processo. A copigmentação não ocorre a valores de pH muito baixos, dado que as antocianinas se encontram na forma de catião flavílio, nem a valores de pH muito elevados, por não ser possível a formação de antocianinas carregadas eletricamente. Em vinhos novos, este fenómeno ocorre com facilidade devido ao facto de um vinho novo possuir uma maior concentração de antocianinas do que um vinho velho.

### **3. Compostos não-flavonóides**

Compostos não-flavonóides são maioritariamente derivados dos ácidos benzóico e cinâmico. Uma outra classe de compostos não-flavonóides nas uvas inclui os estilbenos e os glucósidos de estilbeno, sendo o trans-resveratrol o melhor exemplo.

Ácidos benzóicos	R1	R2
Ácido p-hidroxibenzóico	H	H
Ácido protocatéquico	OH	H
Ácido gálico	OH	OH
Ácido vanílico	OCH <sub>3</sub>	H
Ácido sirínico	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Ácidos cinâmicos	R1	R2
p-cumárico	H	H
cafeico	OH	H
ferrúlico	OCH <sub>3</sub>	H
sinápico	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

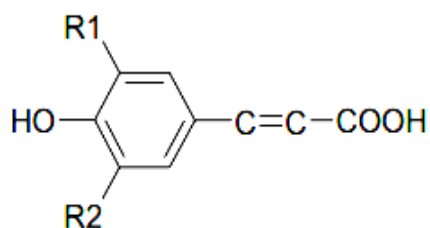
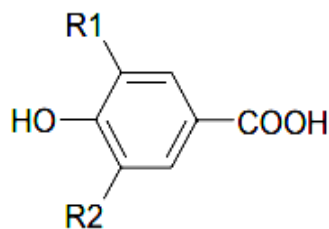
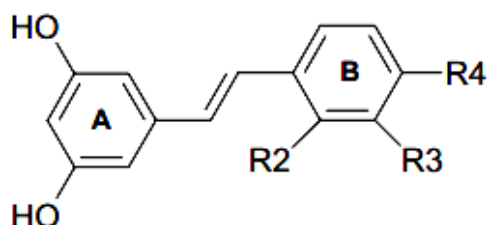


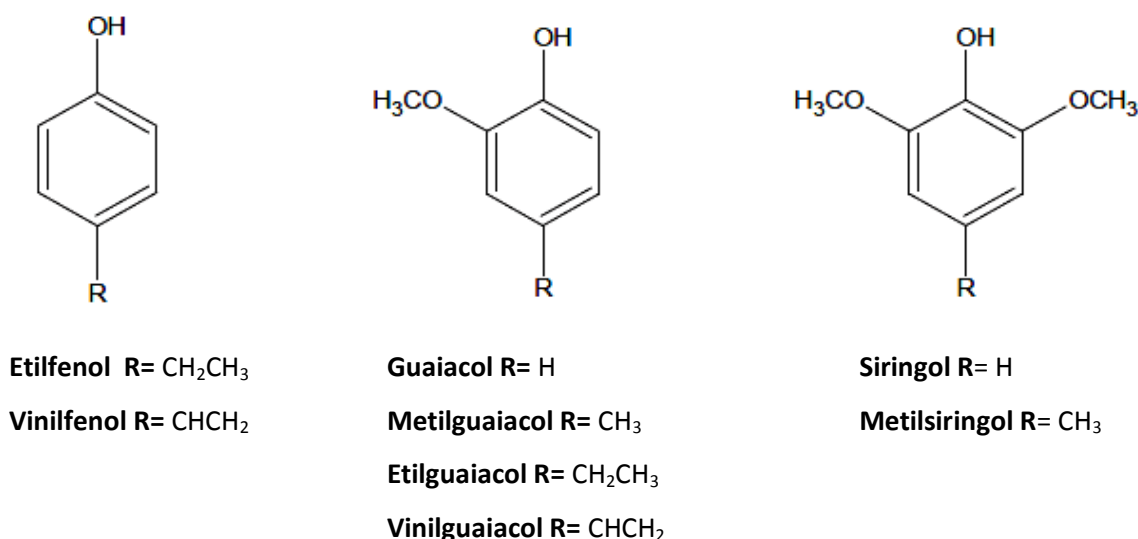
Figura 16 - Estrutura geral dos ácidos benzóicos e cinâmicos (adaptado de Oliveira et al. 2011).



Estilbeno	R2	R3	R4
Pinosilvina	H	H	H
Resveratrol	H	H	OH
Hidroxi-resveratrol	OH	H	OH
Piceatanol	H	OH	OH
Rapontigenina	H	OH	OCH <sub>3</sub>

Figura 17 - Estrutura geral dos estilbenos.

Fenóis voláteis também estão incluídos nesta classe de compostos (figura 18).



**Figura 18** - Compostos não-flavonóides mais comuns no vinho (adaptado de Oliveira et al. 2011)

Uma classe diferente de compostos não-flavonóides são os taninos hidrolisáveis. No vinho estes compostos derivam do contato com a madeira e os seus valores rondam os 250 mg/L, após envelhecimento de dois ou mais anos (Quinn e Singleton 1985). Os taninos hidrolisáveis são ésteres de glucose (ou outros açúcares) e de ácidos fenólicos como do ácido gálico (taninos gálicos) e do ácido elágico (taninos elágicos).

#### 4. Polissacáridos

Os vinhos tintos são ricos em polifenóis mas contém também outros componentes que podem influenciar a adstringência, entre os quais os polissacáridos.

Na última década, a estrutura dos polissacáridos presentes no vinho tem vindo a ser caracterizada (Pellerin et al. 1995, Pellerin et al. 1996, Vidal et al. 2000) e algumas das suas propriedades determinadas (Vernhet et al. 1996, Vernhet et al. 1999, Riou et al. 2001).

Os principais polissacáridos presentes nos vinhos derivam das uvas - proteína-arabinogalactanos (Brillouet et al. 1992) e ramnogalacturanos - I e II (Doco e Brillouet 1993, Pellerin et al. 1996) e das paredes celulares de leveduras - as manoproteínas (Villetaz e

Amas 1981, Waters et al. 1994), representando respetivamente 42, 4, 19 e 35% da totalidade de polissacáridos presentes no vinho (Vidal et al. 2003).

Recentemente tem sido demonstrado que diferentes classes de polissacáridos podem modificar especificamente a agregação de taninos em soluções modelo de vinho (Riou et al. 2002). Este trabalho tem grande importância, dado que demonstra o equilíbrio coloidal que ocorre e que é considerado como o parâmetro-chave das propriedades sensoriais dos taninos nos vinhos. Por outro lado, os polissacáridos são vistos como os responsáveis pela suavidade do vinho (Semichon e Flanzky 1927).

As interações salivares proteína-tanino parecem ser as responsáveis pela sensação de adstringência nos vinhos tintos. Os polissacáridos podem inibir estas interações nos vinhos tintos (Ozawa et al. 1987). Os mesmos autores observaram uma libertação de pequenos fragmentos de pectinas solúveis, tal como sucede no amadurecimento de frutas e sugerem que existe uma competição com as proteínas salivares por substratos polifenólicos, alterando a resposta e a percepção da adstringência.

Inúmeros estudos *in vitro* têm sido desenvolvidos, mostrando que os complexos polissacáridos podem quebrar as interações proteína-tanino por diferentes mecanismos; inibindo as interações proteína-tanino (Escot et al. 2001, Carvalho et al. 2006) ou inibindo a precipitação dos complexos proteína-tanino (Mateus et al. 2004, De Freitas et al. 2006), no entanto, os polissacáridos poderão limitar a concentração de proantocianidinas disponíveis, diminuindo desta forma a adstringência. Além do mais, algumas famílias de polissacáridos têm sido descritas como compostos capazes de interagir com taninos (Riou et al. 2002, Poncet-Legrand et al. 2007) ou com agregados de proantocianidinas disponíveis no meio, originando complexos solúveis (Riou et al. 2002).

Vidal (2004) e McRae (2011) estudaram sensorialmente a percepção da adstringência em soluções modelo de vinho, revelando que os polissacáridos ácidos têm maior impacto na redução da sensação de adstringência, devendo-se essencialmente às alterações de lubrificação da boca e de formação de complexos com os compostos adstringentes. RG-II são os polissacáridos mais ácidos dos vinhos (Vernhet et al. 2006).

Os polissacáridos neutros também tendem a diminuir a intensidade da adstringência (Vidal et al. 2004).

Os polissacáridos do vinho podem ter um efeito prejudicial na performance das membranas de microfiltração do vinho (Vernhet et al. 1999), podem proteger o vinho da formação de turvação proteica e têm um efeito de colóides protetores (Doco et al. 2000).

## 5. Micro-oxigenação

As barricas de carvalho têm sido usadas no envelhecimento de vinhos tintos, devido às vantagens que o contacto do vinho com a madeira envolve. A madeira permite uma difusão baixa e contínua do oxigénio pelos seus poros e a extração de variados compostos (compostos voláteis, taninos e ácidos fenólicos), resultando numa melhoria da qualidade do vinho e de um aprimoramento das suas características organoléticas altamente apreciadas na qualidade dos vinhos tintos (Escalona et al. 2002). Porém, o envelhecimento em barricas requer longos períodos de contacto. Este facto, associado ao elevado custo das barricas, ao tempo de vida do seu uso, à necessidade de um grande espaço para armazenamento e manutenção envolvidas, torna este método tradicional de envelhecimento um processo de elevados custos e laborioso (Garde-Cerdán e Ancín-Azpilicueta 2006). É de salientar que à medida que as barricas se tornam mais velhas, são mais suscetíveis à colonização de microorganismos indesejáveis, tais como *Brettanomyces*, que poderão atribuir ao vinho concentrações elevadas de etilfenóis, com os seus característicos aromas medicinais, couro e suor de cavalo (Suarez et al. 2007).

Desta forma, a procura de redução de custos e técnicas mais simplificadas, encorajaram o desenvolvimento de sistemas de envelhecimento alternativos, tais como o uso de pedaços de madeira, mais conhecidos como chips de madeira, que aceleram o envelhecimento, encurtando o tempo de contacto, sem diminuição da qualidade do vinho produzido (García-Carpintero et al. 2011), atribuindo características sensoriais semelhantes às obtidas em vinhos estagiados em barricas (Rodríguez-Bencomo et al. 2008).

Foi em 1991 que Patrick Ducournau e a família LAPLACE desenvolveram a técnica da micro-oxigenação (MO). Esta técnica, apenas foi autorizada na Europa em 1996 (Gómez-Plaza e Cano-López 2011). Já o uso de pedaços de madeira tem sido mais controverso, tendo sido apenas autorizada e regulamentada a sua utilização em Outubro 2006 (EC (2006)).

Contudo, há que ter em conta que os processos oxidativos que ocorrem em barricas, não ocorrem em cubas (Ortega-Heras et al. 2010, Arfelli et al. 2011). A fim de mimetizar a oxigenação natural que ocorre em barricas, a adição de doses controladas de oxigénio deverão ser consideradas. Este processo é denominado de MO, que tem como objetivo simular numa cuba o que se passa numa barrica. Porém, a MO não providencia os aromas e os taninos elágicos que o contacto do vinho com a madeira adquire.

A combinação da MO com a maceração de chips de madeira tem sido considerada por vários investigadores (Del-Álamo et al. 2010, Gay et al. 2010, Cejudo-Bastante et al. 2011). No entanto, há que prevenir o uso excessivo de oxigénio, dado que induz a formação de moléculas de elevado peso molecular que são incapazes de permanecer em solução,

causando a precipitação de material polimérico e atribuindo ao vinho uma intensidade de cor reduzida (Castellari et al. 2000, Parish et al. 2000, Atanasova et al. 2002, Celotti e Zucchetto 2004, Cano-López et al. 2006, Du Toit et al. 2006, Cano-López et al. 2007, Perez-Magariño et al. 2007).

O oxigénio é muito importante para a evolução fenólica de um vinho tinto, particularmente durante envelhecimento. O envelhecimento em barrica afeta o vinho devido à sua permeabilidade ao oxigénio (Vivas 2000); uma leve oxigenação durante o estágio em tanques inox foi proposta para um aumento da qualidade do vinho (Pontallier e Ribereau-Gayon 1983, Moutounet et al. 1996). Contudo uma elevada oxigenação favorece a oxidação do vinho, enquanto uma oxigenação controlada com a mesma quantidade de oxigénio (3-9 mL/L/mês) (Ferrarini et al. 2001) poderá estabilizar a cor do vinho (Atanasova et al. 2002, Malien-Aubert et al. 2002) induzindo a formação de pigmentos poliméricos azul-vermelho resultantes da condensação direta de antocianinas com outros flavonóides ou resultantes da combinação dos pigmentos e flavonóides com pontes etílicas (Timberlake e Bridle 1976, Atanasova et al. 2002). Estas reações químicas poderão induzir algumas alterações fenólicas produzindo compostos extremamente corados (Timberlake e Bridle 1976) reduzindo a adstringência e afetando a cor e sabor do vinho (Moutounet et al. 1996).

O uso de chips e aduelas, têm sido testados para reduzir custos e melhorar o processo tecnológico do processo de envelhecimento do vinho (Spillman 1999). Os extratos de madeira Francesa (*Quercus petraea*) são mais ricos em fenóis, conferindo mais adstringência reforçando a estrutura dos vinhos e pobres em compostos aromáticos comparativamente com a madeira Americana (*Quercus alba*) (Singleton 1974). A madeira introduzida poderá influenciar o perfil químico e sensorial do vinho, devido aos vários compostos, tais como os ácidos gálico, ferúlico, vanílico, elágico, taninos elágicos (Viriot et al. 1994) e taninos (Fernández de Simon et al. 1996) que poderão ser extraídos da madeira usada.

No final da fermentação, o vinho poderá estagiar usando a técnica da *bâtonnage* por 3 – 8 meses; durante este tempo, as células das leveduras libertam alguns componentes que poderão contribuir para o envelhecimento do vinho (Escot et al. 2001). Esta operação, poderá aumentar a estabilização do vinho em termos de cor e proteínas (Moine-Ledoux e Dubourdieu 1997, Escot et al. 2001). O consumo de oxigénio no vinho aumenta com o contacto das borras das leveduras (Salmon et al. 2000, Fornairon-Bonnefond e Salmon 2003).

Quando um vinho é envelhecido em sistemas alternativos a barricas, usando produtos de madeira alternativos e pequenas doses de oxigénio, segue-se que as doses de oxigénio deverão ser ajustadas individualmente, dependendo do tipo de produto em uso (chips,

aduelas ou blocos) e da sua origem botânica, tosta, porosidade. Se for considerado as diferentes formas de adicionar oxigénio a cubas de estágio, encontram-se duas estratégias completamente distintas. A primeira, denominada de micro-oxigenação, consiste na adição contínua de pequenas doses fixas de oxigénio (mg/L/mês). As quantidades adicionadas terão de ser semelhantes às doses de oxigénio contribuídas pelas paredes das barricas, que foram previamente estimadas encontrando-se entre os valores de 2-4 mL/L/mês que geralmente não é controlada com precisão (Castellari et al. 2000, Du Toit et al. 2006).

A segunda refere-se a quando um vinho é envelhecido com pedaços de madeira e oxigénio, o oxigénio dissolvido no vinho durante o processo de MO reage com os componentes do vinho e decresce para concentrações muito baixas (acima de 10 µg/L). Subsequentemente, no estado estático (durante período de envelhecimento) a cinética de dissolução é mais lenta que a cinética de consumo, daí resultam as baixas concentrações de oxigénio dissolvido no vinho, com uma média de cerca de 10 a 40 µg/L (Vivas 2000a).

Diferentes métodos de MO resultam em diferentes vinhos. A razão de permeabilidade do oxigénio em barricas novas Francesas encontra-se entre 20 mL de O<sub>2</sub>/L de vinho/ano (1.66 mL/L/mês) e 2.50 mL/L/mês (Moutonet et al. 1998, Kelly et al. 2003), sendo os valores em barricas novas Americanas mais baixos. (Nevares e Del-Alamo 2008).

### **5.1. Influência do oxigénio na cor e sabor dos vinhos**

As antocianinas são os principais compostos responsáveis pela cor dos vinhos tintos jovens. Contudo, elas são relativamente instáveis e tendem a formar novos compostos durante o estágio e envelhecimento, alguns deles mais estáveis que as antocianinas iniciais. Estes novos compostos formados resultam de reações entre antocianinas e outros compostos fenólicos, especialmente flavan-3-óis (Rivas-Gonzalo et al. 1995, Dallas et al. 1996, Atanasova et al. 2002). Diversos mecanismos têm sido propostos e estudados que confirmam a formação destes novos pigmentos: - Reações diretas entre antocianinas e flavanóis (Fulcrand et al. 2000); - Reações entre antocianinas e flavanóis envolvendo acetaldeído, originando um produto com uma ligação etílica, que poderá ser protonada e originar um composto corado (Atanasova et al. 2002, Saucier et al. 1997); - produtos resultantes das reações de cicloadição C4/C5 das antocianinas com outras moléculas, traduzindo-se numa ligação dupla polarizável, incluindo ácido pirúvico, 4-vinilfenóis, vinilflavanóis, acetaldeídos, que são designadas de piranoantocianinas (Fulcrand et al. 1996, Fulcrand et al. 1997, Rentzsch et al. 2007). Algumas destas reações são favorecidas pela presença de oxigénio ou pelo acetaldeído produzido pelo efeito do oxigénio no etanol. Todos

estes mecanismos resultam na formação de compostos mais estáveis, dado que a cor é mais resistente à descoloração pelo  $\text{SO}_2$  e providenciam melhor coloração ao pH do vinho (Mateus et al. 2002). A sua importância relativa, assim como a sua estrutura dos produtos resultantes, depende não só da composição inicial do vinho, mas também da presença de metabolitos das leveduras e da exposição ao oxigénio.

## 5.2. Oxigénio e fenóis

A oxidação é um processo de transferência de eletrões entre espécies redutivas e oxidativas. No vinho, a responsabilidade deste fenómeno é do oxigénio, que é reduzido a alguns intermediários e eventualmente a peróxido de hidrogénio e de seguida a água. Tendo em conta que o vinho tinto pode tolerar saturações de  $\text{O}_2$  (180 mL  $\text{O}_2$ /L) antes de mostrar algum carácter oxidado (Singleton 1987), não há outras substâncias oxidáveis, além dos fenóis, em quantidades suficientes no vinho para reagir com esta quantidade de oxigénio. Os iões férricos e cúpricos podem reagir e complexar em presença de oxigénio, mas a sua concentração presente nos vinhos atuais (tecnológicos) excluem essa possibilidade (Singleton 1987). O ácido tartárico, durante a sua conversão a ácido dihidroximaleico e a sua oxidação, foi também sugerida como sendo o maior substrato do oxigénio (Singleton 1987), mas sem evidências que suportem o desaparecimento de ácido tartárico suficiente, tendo em conta a quantidade de oxigénio consumido. Além disso, tendo em conta as diferenças entre vinhos brancos e tintos quanto à sua capacidade de saturação de oxigénio, a influência do conteúdo de ácido tartárico é deixado por terra. Desta forma, nenhum outro grupo de potenciais substratos, além dos fenóis, é significativo, pelo menos em vinhos secos (Gómez-Plaza e Cano-López 2011).

Ao típico pH do vinho, as interações entre fenóis e oxigénio apenas ocorrem significativamente se catalizadas por metais. Contudo, a valores de pH mais altos (4.0), haverá grosseiramente cerca de nove vezes mais iões fenolato que a pH 3.0, e a taxa de auto-oxidação deverá ser cerca de nove vezes mais rápida (Singleton 1987). Isto explica porque vinhos desequilibrados com valores de pH mais elevados sofrem oxidação mais rapidamente e não envelhecem da melhor forma. Este facto ilustra porque é mais adequado pHs mais baixos, o mais cedo possível, dado que melhora a maturação dos vinhos (tintos em especial) vinificados com uvas mais maduras de vindimas e regiões mais quentes (Gómez-Plaza e Cano-López 2011).

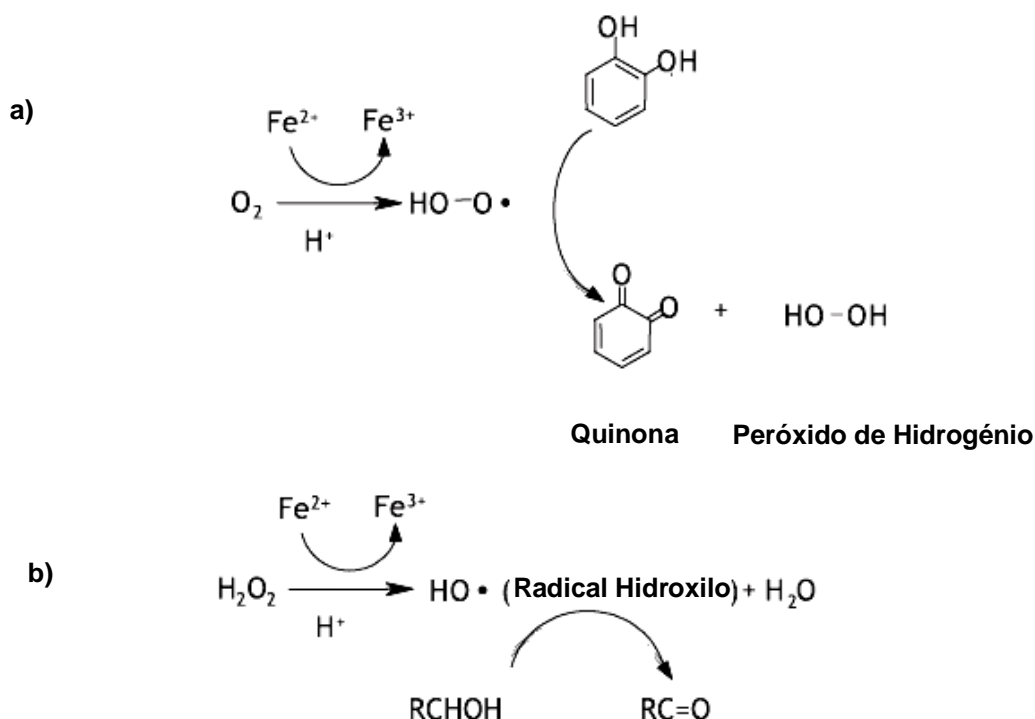
Waterhouse e Laurie (2006) prevêm os passos mais prováveis para a redução do oxigénio. No primeiro passo (figura 19 a), o ferro reduz o oxigénio a radical hidroperoxilo,



não sendo muito reativo para a maioria dos substratos. No entanto, os compostos fenólicos são uma exceção, ocorrendo a formação de quinonas e peróxido de hidrogénio.

Quando o peróxido de hidrogénio reage com ferro, origina o radical hidroxilo (figura 19 b) muito instável reagindo imediatamente. Ele não reage seletivamente com anti-oxidantes tais como fenóis, mas sim com todas as substâncias presentes em solução, quase em proporção à sua concentração. Os produtos resultantes esperados no vinho são a oxidação do etanol produzindo acetaldeído e dos ácidos orgânicos produzindo cetoácidos. O mecanismo desta reação implica a formação de muitos outros produtos tais como glicerol, ácidos e açúcares. Assim com etanol, muitos produtos formados poderão ser cetonas e aldeídos eletrofílicos. Por exemplo, ácido málico forma ácido pirúvico, enquanto que ácido tartárico forma inúmeros pequenos aldeídos.

É de referir que, os produtos secundários da redução do oxigénio produzidos em maior extensão são quinonas, aldeídos e cetoaldeídos (Singleton 2001, Cheynier et al. 2002, Danilewicz 2003).



**Figura 19** - Mecanismos mais prováveis para a redução do oxigénio no vinho (adaptado de Waterhouse e Laurie 2006).

### **5.3. Alterações na estrutura e aroma dos vinhos: efeito do oxigénio no corpo e adstringência**

Diferentes moléculas fenólicas estão envolvidas no amargor, adstringência e estrutura dos vinhos tintos, mas são essencialmente os flavanóis os responsáveis por estas características. Os taninos são moléculas altamente reativas. Os taninos de pequeno tamanho molecular (monómeros e oligómeros) são mais amargos que adstringentes, enquanto que moléculas maiores (polímeros) são altamente adstringentes e pouco amargas (Vidal e Aagaard 2008), demonstrando que a adstringência aparece como função do comprimento da cadeia do tanino (Vidal et al. 2003). Os taninos mudam em comprimento da cadeia e estrutura durante o envelhecimento do vinho, devido às reações de despolimerização causadas pelo meio ácido do vinho e pelas reações de repolimerização. Estas transformações poderão ocorrer tanto em presença ou ausência de oxigénio, contudo, as estruturas resultantes serão diferentes, dependendo do passado do vinho (Vidal e Aagaard 2008). A presença de oxigénio induz a formação de diferentes aldeídos, sendo os acetaldeídos os mais abundantes. Consequentemente, o acetaldeído poderá reagir rapidamente com moléculas de taninos. Os produtos resultantes não são tão importantes como as reações diretas C4-C8 e C4-C6 de polimerização entre as moléculas de procianidinas, que são menos adstringentes (Ribéreau-Gayon et al. 1983, Tanaka et al. 1994). A polimerização poderá formar estruturas macromoleculares que precipitam e como resultado, tornam-se inativas em termos de adstringência (Es-Safiet al. 1999).

Além disso, a interação de antocianinas com procianidinas pode influenciar o sabor do vinho dado que podem formar sub-unidades terminais, prevenindo a continuidade da polimerização (Monagas et al. 2005), não contribuindo significativamente para a adstringência (Vidal et al. 2004).

### **5.4. Melhoria do aroma do vinho: diminuição dos aromas vegetais e reduzidos**

Um dos objetivos da MO é a obtenção de melhores aromas do vinho, aumentando as notas de fruta e diminuindo algumas características vegetais. Ortega-Heras et al. (2008) descobriram algumas diferenças dos compostos voláteis devido ao uso desta técnica mas não se verificou redução dos compostos herbáceos (em particular os compostos C6). Assim, a diminuição das notas herbáceas descritas poderão estar relacionadas com outros compostos. Pensou-se que este efeito resultava da variação da concentração de pirazinas,

mas este facto não foi confirmado experimentalmente (Vidal e Aagaard 2008). Os odores de alguns compostos de enxofre, como os tióis, poderão complementar os aromas das pirazinas e compostos C6, contribuindo para os odores herbáceos do vinho. A MO promove a oxidação de alguns tióis, resultando um carácter menos vegetal (Vidal e Aagaard 2008).

Um outro problema a considerar em alguns vinhos, é o aparecimento de aromas reduzidos, que são atribuídos aos compostos de enxofre. Uma das razões para os denominar aromas reduzidos é porque eles normalmente surgem quando o potencial redox no vinho é baixo. Este facto deve-se à presença de elevados compostos voláteis de enxofre que têm como descritores aromáticos aromas a cebola, borracha queimada, ovos estragados ou alho (Jackson 2000).

Inúmeras formas reduzidas de enxofre poderão ser encontradas no vinho (Rauhul 2009):  $H_2S$ , que é produzido durante a fermentação e cuja presença poderá ser controlada, especialmente no final da AF porque ele é substrato para outros compostos de enxofre; Tióis, que se formam normalmente no final da AF e durante o período pós-fermentação, tendo estes um limiar de perceção muito baixo; Sulfuretos e dissulfuretos, formados durante o processo de vinificação e também pela oxidação de tióis; estes não representam um grande problema pois o seu limiar de perceção é mais alto, contudo são aromas mais difíceis de se retirar num meio redutor, tal como um vinho engarrafado, podendo estes reverter para tióis.

O arejamento, pode não remover totalmente sulfuretos, mas simplesmente mudar a sua forma, descritores sensoriais e limiares de perceção (Zoecklein 2007). No entanto, estudos feitos por McCord (2003) mostraram que a MO reduziu compostos de enxofre indesejáveis, metanotiol e etanotiol para níveis abaixo do seu limiar de perceção, sem o aumento significativo de dimetil sulfureto. Uma possível explicação para este facto, poderá ser o papel desempenhado pelas quinonas. Em presença de oxigénio, polifenóis são convertidos em quinonas; estas reagem com tióis numa reação irreversível (Waterhouse e Laurie 2006, Vidal e Aagaard 2008). Desta forma, assegurando um fornecimento moderado de oxigénio, promovendo uma produção de quinonas constante ao longo da vida do vinho, as moléculas de tiol poderão ser capturadas, não só as moléculas de tiol formadas durante a fermentação, mas também as que se formam por hidrólise de tioésteres ou pela conversão de dissulfuretos em tióis em condições anaeróbicas (Gómes-Plaza e Cano-López 2011).

## 5.5. Simulação do envelhecimento em barrica

Um dos principais objetivos, quando foi desenvolvida a técnica da MO, foi simular em cuba a incorporação lenta de oxigénio tal como ocorre em barrica.

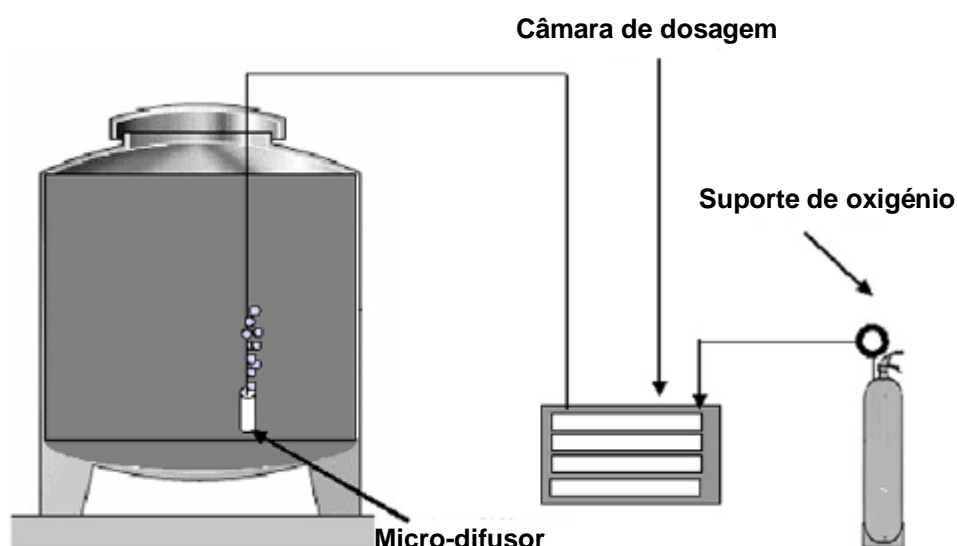
A maioria dos estudos referentes a esta técnica, conferem que a MO induz alterações na cor do vinho e poderá ser comparada com o que ocorre em barrica durante o seu envelhecimento (Castellari et al., 2000, Parish et al. 2000, Atanassova et al. 2002, Celotti e Zucchetto 2004, du Toit et al. 2006, Cano-López et al. 2007, 2006a, Pérez-Magariño et al. 2007). No entanto, atualmente apenas o estudo de Cano-López et al. (2010) compara ambas as técnicas. O estudo consiste na análise da evolução dos parâmetros cromáticos do vinho durante 3 meses de MO, simultaneamente com o envelhecimento do mesmo vinho em barricas, novas e usadas, de carvalho americano durante o mesmo período de tempo. Os resultados mostram que o ensaio com MO induz uma alteração cromática semelhante à ocorrida, no mesmo período de 3 meses, em barricas de carvalho. Contudo, eles não maturam de forma semelhante quando o vinho é engarrafado. Após seis meses em garrafa, os vinhos micro-oxigenados eram cromaticamente diferentes que os que envelheceram em barrica, mostrando uma maior percentagem de tons amarelos, o que corresponde a uma maior evolução da cor. Possivelmente os compostos fenólicos extraídos da madeira (taninos elágicos, ácidos fenólicos e aldeídos provenientes da madeira) mostram um importante papel na proteção da cor dos vinhos. Neste sentido, os estudos recaíram sobre os efeitos do uso de chips, durante o processo de MO de vinhos tintos, na cor e composição fenólica, mas também concluíram que a MO tem muito mais impacto na cor dos vinhos que o uso de chips (Sartini et al. 2007, Pérez-Magariño et al. 2009).

Em outro estudo, o uso de chips ou a combinação de chips e MO em vinho, conclui-se que estes foram os vinhos preferidos pelo consumidor quando comparados com um vinho estagiado em cuba inox ou apenas com MO sem adição de chips (Baptista Ortín et al. 2008).

## 5.6. Uso da micro-oxigenação

### 5.6.1. Equipamento necessário

O equipamento básico necessário para a MO inclui um suporte de oxigénio, um sistema de dosagem e um micro-difusor (figura 20).



**Figura 20** - Representação esquemática de um sistema micro-oxigenado (adaptado de Gómez-Plaza e Cano-López 2011).

A dose de oxigénio a ser injetada no vinho, é conseguida através do enchimento de uma câmara de volume conhecido a alta pressão. Esse volume é depois transferido a baixa pressão para o circuito até ao difusor no interior do tanque. O difusor (cerâmica porosa) converte o fluxo de gás num fluxo contínuo de pequenas bolhas, que dispersam rapidamente no vinho. Um programador de tempo controla o enchimento da câmara de dosagem e a baixa pressão do circuito.

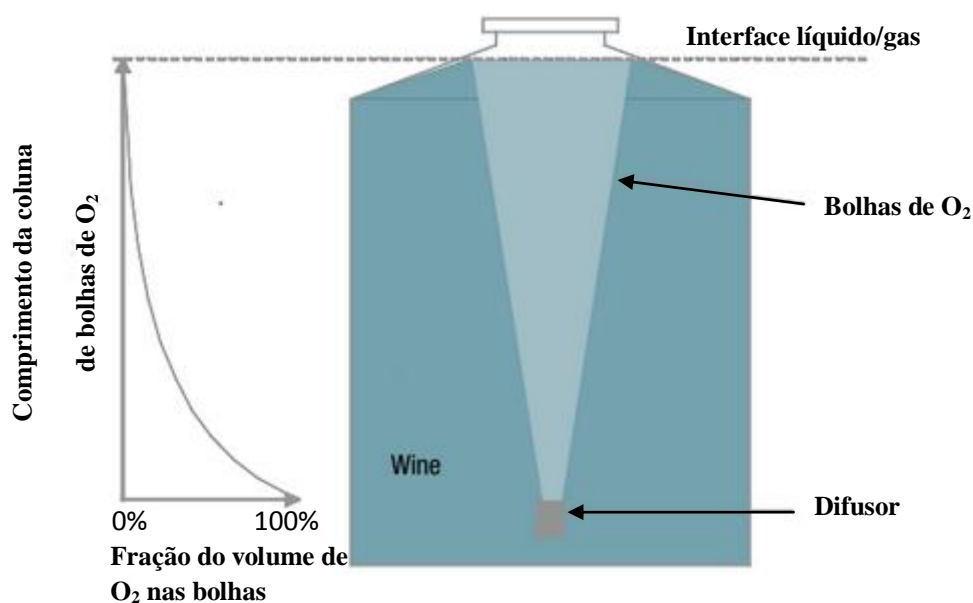
As bolhas de oxigénio percorrem a coluna de vinho da cuba, dissolvendo-se no seu percurso até à superfície. Este sistema implica que as bolhas percorram uma determinada distância que permita a total incorporação do gás no vinho e sua dissolução. Se tal não ocorrer, o oxigénio irá acumular-se no topo do tanque, sendo dissolvido apenas uma pequena fração desconhecida de oxigénio.

Em termos práticos, isto limita a aplicabilidade da técnica de MO a vinhos armazenados em cubas de 2,5 m de altura ou superior, sendo inadequado o seu uso para cubas mais pequenas e para barricas.

A inter-fase de transferência do oxigénio é principalmente determinada pelo tamanho da bolha formada (Mewes e Wiemann 2003). O diâmetro da bolha durante MO foi estimado

para que seja 310  $\mu\text{m}$  e 668  $\mu\text{m}$  no local de libertação do oxigénio, para difusores com poros de 1  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$  respetivamente à dosagem de 25 mg/L/mês.

Na ausência da ocorrência de homogeneização do vinho durante a MO, o tamanho da bolha relativamente às dimensões do tanque e a cinética de consumo do oxigénio irão determinar a concentração de oxigénio dissolvido. A distribuição do oxigénio, as reações oxidativas e alterações na composição do vinho não ocorrerão de forma homogénia. Em cubas de grande volume, o vinho exposto ao oxigénio poderá representar apenas uma pequena proporção da totalidade do volume. O uso de apenas um difusor poderá não ser a maneira mais efetiva de introduzir oxigénio no vinho (Dykes e Kilmartin 2007).



**Figura 21** - Representação esquemática do sistema de incorporação de oxigénio no vinho (adaptado de Dykes e Kilmartin 2007).

O modelo do micro-oxigenador usado pela empresa para as amostras em estudo, está representado na figura 22.



**Figura 22** - Micro-oxigenador usado pela empresa : “Este aparelho enológico da *Parsec* é o único produto no mercado capaz de dosear a quantidade de oxigénio durante o processo enológico, com precisão e credibilidade, recorrendo à equação dos gases perfeitos (  $P.V = n.R.T$  ).”

A *Parsec* propõe diferentes concentrações de oxigénio (mg/L/mês) assim como tempo de aplicação (2 a 8 meses), de acordo com os objetivos pretendidos no vinho final:

- reproduzir em cuba as condições de oxigenação em barricas: 0,8 a 2,5 mg/L/mês;
- polimerização dos taninos da madeira durante o envelhecimento antes do engarrafamento: 0,7 a 1,8 mg/L/mês;
- melhorar a intensidade e a estabilidade da cor formando pigmentos: 0,5 a 1,0 mg/L/mês;
- obter vinhos “redondos” com baixas oxidações para combinar os taninos reactivos: 0,8 a 3,5 mg/L/mês;
- envelhecer vinhos sobre as borras finas, sem aromas indesejáveis de compostos de enxofre: 0,3 a 2,5 mg/L/mês;
- conservar os vinhos em cubas herméticas, evitando fenómenos de redução: 0,2 a 1,2 mg/L/mês.

É verificado no aparelho, aquando a sua manutenção, se a quantidade de gás libertado é a pretendida.

### **5.6.2. Novos equipamentos**

Algumas novas metodologias têm sido implementadas e poderão ser mais importantes e futuramente mais usadas, nomeadamente métodos de difusão, tanques permeáveis ao oxigénio e micro-oxigenação electroquímica (ELMOX).

Os métodos de difusão baseiam-se na difusão do oxigénio através de uma membrana permeável, substituindo o método de borbulhar oxigénio (Kelly e Wollan 2003, Paul e Kelly

2005). Esta técnica implica o uso de uma tubagem em polidimetilsiloxano, permeável ao oxigénio. A tubagem é colocada dentro da cuba de estágio e conectada a um sistema de baixa pressão que fornece oxigénio atmosférico na dose pretendida. O oxigénio é absorvido pelo polímero e transportado por difusão para o vinho. A acumulação de oxigénio no topo do tanque não é um problema usando esta tecnologia, podendo mesmo ser usada em pequenas cubas (Blaauw 2009).

Uma outra solução é o uso de cubas permeáveis ao oxigénio, desenvolvidas pela Flextank em 2004 ([www.flextank.com.au](http://www.flextank.com.au)) (Flecknoe-Brown 2004, 2005, 2006). Estas cubas de polietileno, são permeáveis ao oxigénio, permitindo a sua passagem pelas paredes de forma semelhante ao que sucede em barricas (Flecknoe-Brown 2004). Uma das desvantagens destes sistemas, é a sua incompleta caracterização em termos de taxas de transmissão de oxigénio. Contudo, a grande vantagem destas técnicas é a ausência de formação de bolhas e o recurso a cubas altas. Além disso, a ausência de bolhas assegura que os compostos voláteis de interesse não sejam despojados do vinho.

Por último, a ELMOX tem como base o processo industrial de eletrólise para produção de reações de oxidação no vinho (Fell et al. 2007). No entanto, a química do oxigénio é um processo complexo, oxidação e redução, que a nível mais simples corresponde à transferência de eletrões. A oxidação de polifenóis e outros constituintes do vinho poderão ocorrer devido a diversos processos, sendo um deles a aplicação de um potencial elétrico entre duas superfícies condutoras em contacto com o vinho.

Uma vantagem deste método, consiste na oxidação de fenóis e da oxidação do etanol a acetaldeído sem produção de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) ou outras espécies reativas de oxigénio (Blaauw 2009).

O uso da ELMOX tem como grande vantagem o controlo preciso do processo de oxidação, mantendo um potencial elétrico pré-determinado entre o ânodo e o cátodo, o que é particularmente útil quando são desejáveis dosagens muito pequenas. A tradicional MO, com formação de bolhas, tem também como inconveniente a permanência de resíduos de oxigénio mesmo após o término da dosagem. Com ELMOX, após a corrente ser desligada, o processo oxidativo é terminado (Dykes 2007).



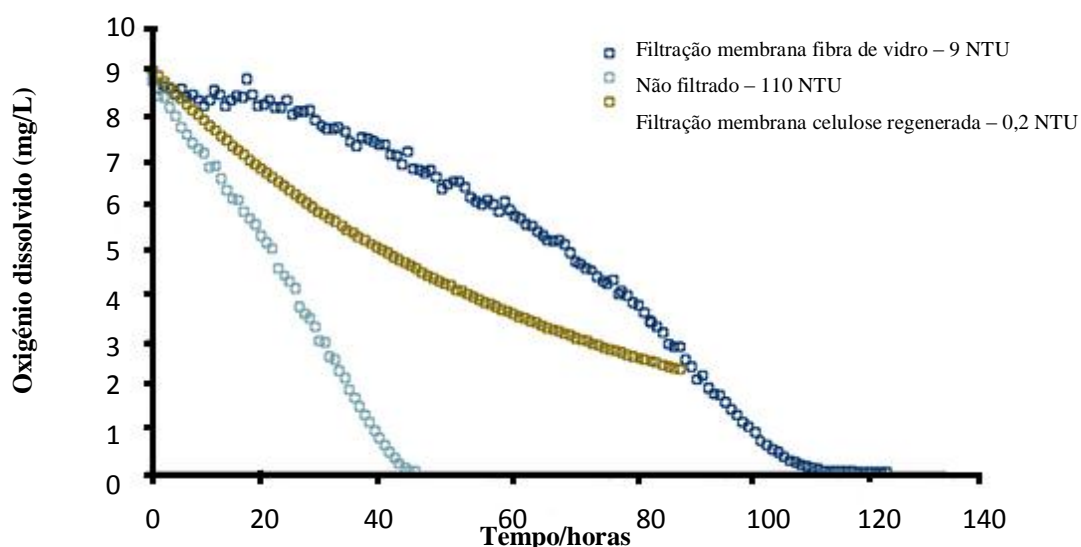
## 5.7. Características iniciais do vinho

Os vinhos mostram diferenças consideráveis para a sua apetência de consumir oxigénio. De um modo geral, essa habilidade está diretamente relacionada com as suas concentrações relativas de polifenóis, uma vez que os compostos fenólicos são os maiores consumidores de oxigénio (60%), conjuntamente com etanol (20%) e dióxido de enxofre (12%) (Devatine et al. 2007).

A MO é mais adequada para vinhos tintos com uma concentração elevada de fenóis totais, enquanto que para vinhos pouco corados, um tratamento excessivo é facilmente alcançado, devendo-se usar a MO com cuidado (du Toit 2007b).

Os resultados de Cano-López et al. (2008) demonstram que diferentes vinhos foram afetados de modo diferente pela MO. Em geral, vinhos micro-oxigenados possuem uma percentagem mais elevada de novos pigmentos derivados de antocianinas. A sua formação é favorecida em vinhos com conteúdos fenólicos totais mais elevados. Estes compostos, por sua vez, aumentam a intensidade corante do vinho. Vinhos com conteúdo fenólico mais baixo, são pouco afetados pela MO e a observação da evolução do grau de polimerização dos taninos, sugere que poderá ter ocorrido uma oxigenação excessiva. Mesmo entre vinhos com conteúdos de fenóis totais elevados, os que possuem maior proporção de antocianinas livres são mais favorecidos pelo MO. A MO de um vinho com poucas antocianinas livres, irá favorecer a polimerização ilimitada de taninos, levando à secura e acastanhamento.

Um outro aspeto importante a ter em consideração é se se trata de um vinho filtrado ou não. A cinética do consumo de oxigénio foi medida experimentalmente usando um equipamento especial, desenhado e construído na Universidade de Auckland (Dykes 2007).



**Figura 23** - Cinética do consumo de oxigénio de um vinho (Cabernet Sauvignon) antes e após filtração (adaptado de Dykes e Kilmartin 2007).

Duas curvas do mesmo vinho estão esquematizadas na figura 23, filtrado (1,0 µm fibra de vidro) e não filtrado. O efeito de limpeza do oxigénio das borras é notório, além do mais ambas as curvas têm a mesma configuração. Ensaio semelhantes demonstram uma cinética de primeira ordem no caso de um vinho filtrado com membrana de celulose (0,45µm) (Dykes e Kilmartin 2007).

## 5.8. Concentração de SO<sub>2</sub> presente no vinho

As propriedades do dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) presente nos mostos e vinhos são desde há muito tempo conhecidas. Entre elas:

- ação anti-oxidante – combina o oxigénio dissolvido no meio, sendo uma reação lenta, com efeitos práticos nos vinhos (oxidação química), mas sem efeitos para a oxidação dos mostos, que é rápida, de natureza oxidásica;

- ação anti-oxidásica – inibe as enzimas oxidásicas presentes nos mostos (tirosinase e lacase de *Botrytis cinerea*), protegendo-os da oxidação a que estão fortemente sujeitos antes do início da FA permitindo assim elaborar vinhos tintos com maior IC e IFT;

- ação inibitória de leveduras – inicial e transitória, pode ser favorável pois origina um arrefecimento e logo uma cinética de fermentação menos tumultuosa. Na vinificação em branco, possibilita a sedimentação das partículas em suspensão ajudando na clarificação;

- ação ativadora de leveduras – Em doses moderadas, embora atrase o arranque da fermentação, permite acabamentos mais completos, talvez devido à destruição de substâncias antifúngicas ou ao aumento da atividade proteásica (maior disponibilidade de aminoácidos);

- seleção de leveduras – a sulfitação permite a eliminação das leveduras menos resistentes a este composto (*Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora*), prevalecendo as mais resistentes e de melhor qualidade (*Saccharomyces cerevisiae*);

- seleção entre leveduras e bactérias – O SO<sub>2</sub> atrasa mas não impede a AF (leveduras), mas as bactérias existentes na uva são senão inativadas, pelo menos fortemente paralisadas. Benéfico no caso de bactérias indesejáveis, mas discutível no caso das bactérias ácido-láticas. A dose de SO<sub>2</sub> a aplicar nos mostos tintos não deve ser demasiado elevada que impeça a MLF;

- favorecimento da dissolução de compostos da película – a destruição das células de película pelo SO<sub>2</sub>, favorece a libertação dos compostos fenólicos, em particular das antocianinas, particularmente no caso de macerações curtas, ou no caso de macerações sulfíticas

- melhorador do aroma dos vinhos novos – protegendo o aroma dos vinhos novos, minimizando a revelação de aromas defeituosos no caso de vinhos elaborados de uvas atacadas de podridão (Carvalheira, [http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/geral/files/so2\\_conservacao\\_vinhos.pdf](http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/geral/files/so2_conservacao_vinhos.pdf)).

O SO<sub>2</sub> além de ter propriedades anti-sépticas, anti-oxidásicas e anti-oxidantes interfere nas muitas reações-chave de oxidação: por exemplo, ele reage com o peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e acetaldeído, que são indispensáveis para as reações de condensação, ligando-se também diretamente a antocianinas, inibindo a formação de pigmentos poliméricos (Danilewicz 2008). O SO<sub>2</sub> possui também a habilidade de se combinar com moléculas dicarboniladas: glioxal, metilglioxal e hidroxipropanedial (concentrações mais elevadas em uvas atacadas de podridão cinzenta).

Os resultados de um estudo realizado por Tao, Dykes, e Kilmartin (2007) mostram claramente que o SO<sub>2</sub> possui um efeito moderador na interação do oxigénio com polifenóis. A MO em vinhos após adição de SO<sub>2</sub> conduz à redução e ocorrência de menos reações significativas. Havendo maiores concentrações de SO<sub>2</sub>, a micro-oxigenação irá decorrer de forma mais prolongada para produzir o mesmo efeito.

Um pequeno ensaio foi realizado por Dykes (2007) para medir o efeito do SO<sub>2</sub> no desenvolvimento de polifenóis no vinho com e sem oxigénio. A presença de SO<sub>2</sub> teve um efeito significativo no grau de polimerização de proantocianidinas e na concentração de pigmentos estáveis. Uma diminuição do grau de polimerização foi observado durante um período de seis semanas, independentemente da adição ou não de oxigénio. O grau de polimerização, para os ensaios sem SO<sub>2</sub>, aumentou de forma constante durante o período experimental e diminuiu na presença de SO<sub>2</sub>. De forma similar, a formação de pigmentos não branqueáveis foi suprimida e até mesmo retardado na presença de SO<sub>2</sub>, enquanto que para os tratamentos sem SO<sub>2</sub> foi observado um aumento constante. Estes resultados demonstram que o SO<sub>2</sub> tem um grande efeito no desenvolvimento de taninos, mais que o oxigénio. Por outro lado, a MO poderá aumentar o crescimento de micro-organismos aeróbicos, portanto a utilização de pequenas quantidades de SO<sub>2</sub> é necessária para proteger o vinho do desenvolvimento de micro-organismos.

O controlo das populações de micro-organismos depende dos níveis adequados de SO<sub>2</sub>. Nos vinhos, este agente está presente na forma livre e combinada. A forma ativa é a molecular que é calculada pela expressão, estando dependente do pH do meio:

$$[\text{SO}_2 \text{ molecular}] = \frac{[\text{SO}_2 \text{ livre}]}{1 + 10^{-(\text{pH} - 1,8)}} \quad (\text{Fugelsang e Edwards 2007})$$

Doses de SO<sub>2</sub> molecular:

- 0,50 mg/L é suficiente para inibir as bactérias;
  - 0,90 mg/L é a dose de inibição das leveduras de fermentação (*Saccharomyces cerevisiae*);
  - 1,00 mg/L pode-se considerar como dose de completa inibição dos microorganismos;
  - 1,50 mg/L inibe as leveduras com metabolismo oxidante (flor).
- ([http://www.hannacom.pt/pdf/hi\\_84100.pdf](http://www.hannacom.pt/pdf/hi_84100.pdf)).

Há que ter em consideração os limites legais para a sua utilização nos vinhos, pois infelizmente, o SO<sub>2</sub> é irritante, com odor e sabor desagradáveis, e poderá causar problemas graves em consumidores mais sensíveis (Jackowetz et al. 2011).

## 5.9. Momento de aplicação da micro-oxigenação

A MO poderá ser aplicada em qualquer momento durante a vinificação, estágio e envelhecimento. No entanto, quando o objetivo principal é a estabilização da matéria corante, a distinção entre a influência da MO antes ou após MLF (parcialmente relacionada com a diferente concentração de SO<sub>2</sub> mas também com a concentração de antocianinas livres) deverá ser considerada. A MO parece ser muito mais efetiva no melhoramento das características estruturais do vinho antes da MLF, quando os taninos e antocianinas presentes se encontram na forma monomérica. As reações entre taninos e antocianinas ocorrem independentemente da presença de oxigénio, portanto, se o tratamento é apenas iniciado após MLF, este terá de atuar em substratos que sofreram já reações de polimerização e condensação (Nel 2001). Cano-López, Pardo-Minguez, López-Roca, e Gómez-Plaza (2006b) concluíram que os efeitos após MLF na cor e concentração de taninos no vinho, são menos significantes. Antes da MLF, o vinho é rico em antocianinas livres e a MO vai permitir a estabilização das antocianinas e limitar a polimerização dos taninos, desde que as antocianinas se fixem no final da estrutura dos taninos e bloqueiem a sua polimerização (Cano-López et al. 2008).

Após MLF, SO<sub>2</sub> é usualmente adicionado para proteger o vinho e este poderá limitar o efeito da MO, prolongando no tempo o aparecimento dos seus efeitos, o que são condições análogas ao que acontece quando o vinho estagia em barricas (Paul 2002). Não deverá ser esquecido, que o enólogo terá de ter mais cuidado usando micro-oxigenação após MLF, uma vez que um excesso de acetaldeído poderá acumular-se no vinho. A LAB consome acetaldeído durante a MLF (Osborne et al. 2000), desta forma, qualquer excesso de

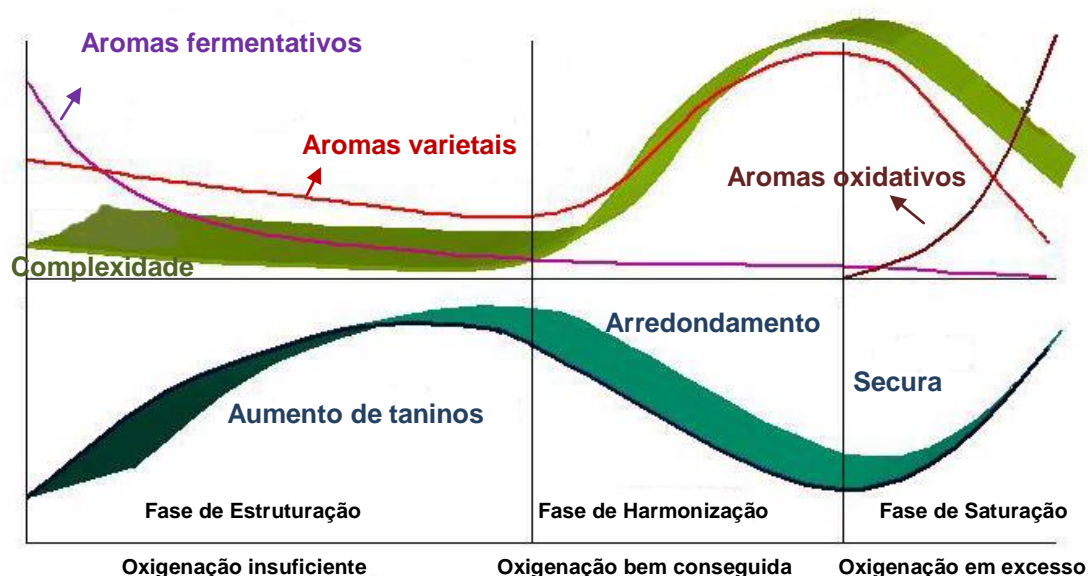
acetaldeído produzido antes da bioconversão do ácido málico em presença de MO, irá ser eliminado pela bactéria, originando um vinho de melhor qualidade organolética. Este efeito não ocorre obviamente após MLF com MO.

Uma estratégia muito comum atualmente é aplicar a técnica de MO antes e após a MLF. A sua aplicação começa com curtas mas altas concentrações pré-MLF, atingindo valores até 100 mg/L/ano (Loch 2002); a sua aplicação pára quando a MLF ocorre espontâneamente e depois é retomada após bioconversão do ácido málico com doses mais baixas e num período de tempo prolongado (Theron 2007, du Toit 2007a, Cano-López et al. 2008, 2006a).

O uso de lisozimas também tem sido testado para retardar a MLF. A lisozima degrada as paredes celulares das bactérias Gram-positivas, tais como *Oenococcus*, *Pediococcus* e *Lactobacillus* e assim inibe a ocorrência da MLF. Isto permite mais tempo para realizar a MO ao vinho antes da MLF, antes da adição de SO<sub>2</sub> (Gómes-Plaza e Cano-López 2011).

### **5.10. Fases envolvidas na micro-oxigenação**

A aplicação desta técnica permitiu definir três fases essenciais dentro da evolução dos vinhos. A primeira fase é denominada “fase de estruturação”, durante a qual a presença de aromas de vinhos jovens diminui, havendo um correspondente aumento do carácter tânico reforçando assim o poder redutor. Os vinhos ganham intensidade havendo um aumento das absorvâncias a 520 e 620 nm. A segunda fase denomina-se por “fase de harmonização”, assiste-se a um aumento da complexidade aromática dos vinhos, um desaparecimento do carácter herbáceo e diminuição da adstringência. E por último a “fase de saturação” (Du Toit et al. 2006, Vinovation 2000, Lesica et al. 2009).



**Figura 24** - Evolução das fases organoléticas do vinho durante o processo de micro-oxigenação (adaptado de Lemaire 1995).

### 5.10.1. Fase de “Estruturação”

A primeira fase da MO é denominada por estruturação e é caracterizada por um aumento na agressividade e intensidade de taninos no paladar (Lesica et al. 2009). Ao mesmo tempo verifica-se um declínio correspondente na intensidade aromática e complexidade do vinho. O fim desta fase é determinado pela inversão destas tendências organoléticas levando a um amaciar do vinho (Lemaire 1995). As características aromáticas vegetais diminuem também neste momento. O sucesso desta fase depende das condições de temperatura que se relacionam diretamente com a velocidade de consumo de oxigénio. Se não houver presença de oxigénio nesta fase, é natural que o vinho em questão apareça mais reduzido e mais “duro” em boca. A melhor altura para se começar a introduzir oxigénio é quando a AF está completa (Ducournau et al. 1998).

### **5.10.2. Fase de “Harmonização”**

A fase de harmonização tem como principais objetivos: - Atingir as qualidades desejadas ao nível aromático; - Melhorar as qualidades sensoriais principalmente ao nível dos taninos; - Estabilizar os aromas reductores; - Eliminar algumas características herbáceas e outros defeitos restantes.

A fase de harmonização é posterior à fase de estruturação. É o período de tempo que vai do envelhecimento até ao engarrafamento do vinho. Esta fase é caracterizada por um aumento de suavidade dos taninos e complexidade do vinho de uma forma geral (Lemaire 1995, Lesica et al. 2009). Todas as modificações que ocorrem são irreversíveis ao contrário do que acontece na fase de estruturação. A fase de harmonização contrasta muitas vezes com a fase de estruturação, uma vez que quanto mais longa for a fase estruturação mais necessária é a fase de harmonização. Esta fase, numa forma geral é sempre a mais longa e a mais difícil de seguir, porque o vinho se torna cada vez mais sensível (Vinnovation 2000).

Os riscos são o desenvolvimento duma adstringência e/ou uma maturação excessiva acompanhada pela perda de frescura e expressão aromática que se reduz. A temperatura tem também um papel importante nesta fase. Estes riscos são especialmente agravados se a qualidade do vinho for fraca (Ducournau et al. 1998).

A dose ideal de oxigénio aplicada é determinada normalmente provando, procurando um maior benefício aromático, mas não causando secura (Lemaire 1995). Assim que os taninos começarem a parecer demasiado secos, é necessário limitar o oxigénio ou até mesmo parar a MO. Se a MO for mantida neste momento, o resultado será um vinho muito liso e fraco, e os aromas da oxidação podem aparecer de uma forma irreversível (Ribéreau-Gayon et al. 1983). Ou seja, se os taninos forem duros, significa que o vinho necessita de algum oxigénio para os tornar mais macios, e que a fase de harmonização deve continuar. Se os taninos estiverem secos, significa que a contribuição do oxigénio deve ser limitada.

De acordo com a definição destes termos, o início de secagem de taninos é acompanhado por uma perda do corpo e estrutura do vinho, segue geralmente este teste padrão: durante a fase de estruturação, quanto mais oxigénio se adicionar, mais duros se tornam os taninos. Durante a fase de harmonização, os taninos amaciam automaticamente, mas se a dose de oxigénio for demasiado elevada, os taninos secarão a boca.

### **5.10.3. Fase de “Saturação”**

Se o vinho é micro-oxigenado por muito tempo, os taninos tendem a secar bastante e tornam-se demasiado adstringentes (Lesica et al. 2009).

Vários fatores podem afetar os resultados obtidos quando a MO é aplicada nos vinhos tintos, destacando-se como mais importantes o momento de aplicação, as doses de oxigénio a aplicar e as características fenólicas do vinho (Cano-López et al. 2008).

Tendo em conta a figura 22 (página 42), é pretendido pela empresa uma oxigenação bem conseguida, no entanto não se pretende que se atinja a parte final da fase de harmonização mas sim a parte intermédia, em que ocorre um arredondamento dos taninos e um aumento dos aromas varientais e complexidade.

## **5.11. Quantidade de oxigénio adicionada**

A dose de oxigénio administrada será obviamente dependente do principal objetivo do tratamento. Por exemplo, a eliminação de aromas reduzidos requer mais baixas doses de oxigénio do que a aceleração da maturação de um vinho.

Contudo, as doses de oxigénio requeridas deverão ser adequadas para a estrutura fenólica do vinho (Paul 2002, Zoecklein et al. 2003), e parece variar consoante a casta, vinha e vindima (Rieger 2000, Pérez-Magariño et al. 2007). Um estudo sobre o efeito de diferentes dosagens de oxigénio no mesmo vinho, mostra que a doses mais elevadas favorece a cor do vinho (Cano-López et al. 2006a), contudo, após um período de envelhecimento em barrica e em garrafa, o vinho com mais baixas doses de oxigénio foi preferido (Cano-López et al. 2007). A maioria dos fornecedores recomendam doses de 10-30 mL/L/mês a aplicar antes da MLF, estando esse tempo dependente da composição fenólica do vinho. Após MLF, as doses recomendadas variam entre 1-5 mL/L/mês, durante 1 a 4 meses.

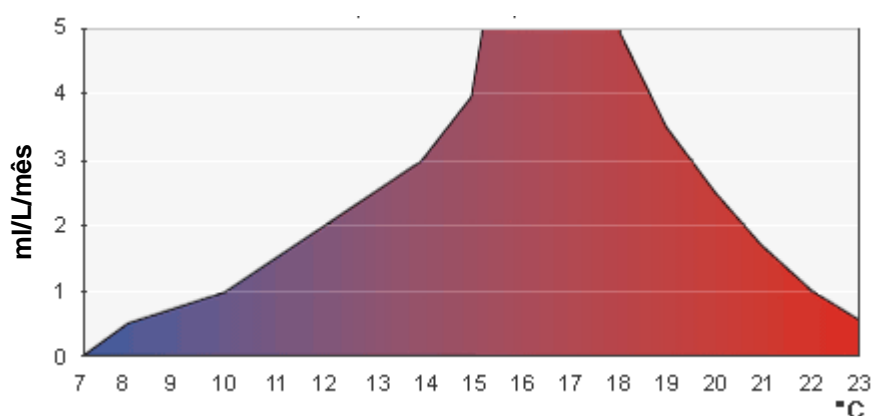
Há a salientar que a duração da MO é empiricamente determinada, baseando-se na análise sensorial e o estilo de vinho pretendido. Alguns fatores poderão afetar a duração do processo, nomeadamente o volume da cuba, a temperatura do vinho, as velocidades das reações químicas, a composição do vinho e a dose de oxigénio. Até à data, não há medições objetivas que determinem a duração e dosagem ideais de oxigénio para um estilo de vinho específico (Lemaire et al. 2002).



## 5.12. Temperatura

A temperatura tem um importante efeito na solubilidade do oxigénio e na taxa de reações de oxidação. É geralmente aceite que, para a MO, a temperatura do vinho deverá rondar os 15°C uma vez que, se a temperatura estiver mais alta conduz a uma baixa solubilidade do oxigénio e se estiver muito baixa, as reações químicas decorrerão de forma muito lenta acumulando-se oxigénio (Nel 2001). Desta forma, é recomendado que a MO ocorra a uma temperatura controlada de 15-16°C (figura 25).

A temperatura é, portanto, um fator limitante. Ela tem uma importante função sobre os mecanismos físicos – difusão, dissolução, sedimentação; e sobre os mecanismos químicos – reações químicas e enzimáticas (oenodev.com).



**Figura 25** - Temperatura aconselhada para as diferentes doses de O<sub>2</sub> (excepto vinificação) (adaptado de [www.oenodev.com/elevage\\_temperature.asp](http://www.oenodev.com/elevage_temperature.asp)).

## 5.13. Riscos que envolvem a micro-oxigenação

Alguns aspetos deverão ser tidos em consideração aquando o uso da MO. O mais importante a ter em conta é o excesso de oxigenação, o qual poderá resultar num excesso de polimerização, secura tânica, perda de cor, perda de frescura e o desenvolvimento de aromas oxidados e a aldeídos (Blaauw 2009). O problema é que não existe uma marca de transição bem definida entre o final do tratamento e um excesso do mesmo.

## 6. Evolução das características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de vinhos

### 6.1. Acetaldeído

O grupo carbonilo ( $C=O$ ), é um grupo funcional importante na bioquímica uma vez que caracteriza os aldeídos, as acetonas, ácidos carboxílicos, ésteres e amidas (Van Neil et al. 1929).

Acetaldeído é o composto carbonílico volátil mais importante no vinho e pode ser formado por duas vias: biológica (atividade de leveduras) e química (pela oxidação do etanol). É uma molécula pequena e muito reativa com aromas herbáceos (erva, maçã, noz verdes). O limite de percepção olfativa (menor concentração de uma substância no meio ambiente detetável através do odor) do acetaldeído é de 0,21 mg/L, podendo tornar-se irritante ao aparelho respiratório quando em concentração superior a 2,00 mg/L. O acetaldeído tem-se mostrado um potente embriotóxico e teratogênico em ratos, podendo ser considerado também um agente mutagênico e carcinogênico (<http://www.cdc.gov/niosh/idlh/intridl4.html>).

**Formação:** existe um conceito errado que a formação do acetaldeído começa no final da AF, quando os vinhos se encontram em contacto com oxigénio atmosférico, ocorrendo a oxidação do etanol formando acetaldeído na ausência de  $SO_2$ . No entanto, a não ser que os vinhos sejam tratados de forma descuidada após AF, a maior parte do acetaldeído encontrado no vinho é resultante da oxidação microbiana do etanol em condições aeróbias, sendo a sua principal via metabólica o processo fermentativo das leveduras durante a AF, quando o ácido pirúvico é transformado pela ação da enzima piruvato carboxilase em acetaldeído (Porretta e Sandei 1991, Nouguer e Marty 1995, Tomasset 1998). As leveduras enológicas, inclusive as comerciais *Saccharomyces cerevisiae*, produzem acetaldeído durante a fase inicial da AF. A sua formação está dependente da exposição ao oxigénio, da presença de metais de transição como cobre e ferro, e de compostos fenólicos. Após ter alcançado um valor máximo, o acetaldeído é reutilizado. Pode ainda ser produzido, em pequenas quantidades, através da oxidação não enzimática.

**Degradação:** Para além da reutilização parcial do acetaldeído pela levedura na segunda metade da AF (dois dias após do início da fermentação), este também é degradado pela LAB.

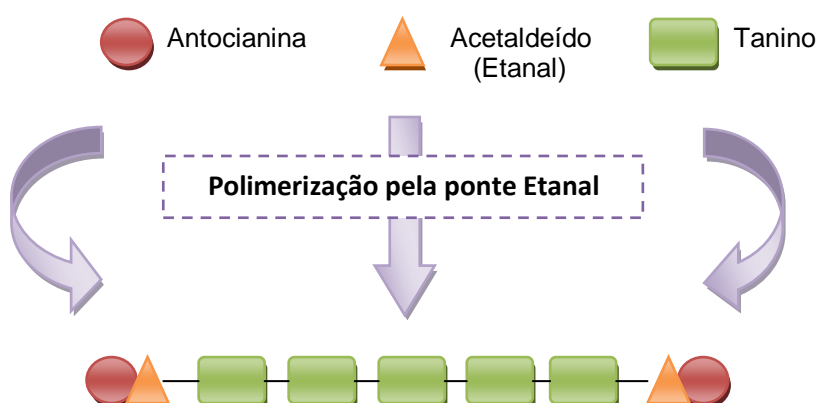
Durante a MLF, o acetaldeído é degradado simultaneamente com o ácido málico ou um pouco mais tarde. Se é desejável a degradação total do acetaldeído, os vinhos não deverão estar estáveis (serem sulfitados) até cinco dias após final da MLF. A MLF permite

também a redução substancial do ácido pirúvico e do ácido  $\alpha$ -cetoglutarico. Consequentemente, permite um ajuste para valores mais baixos de  $\text{SO}_2$  combinado e total.

O acetaldeído participa também, em alguma extensão, em algumas reações químicas tais como as reações de polimerização dos compostos fenólicos contribuindo para a estabilização de vinhos tintos (figura 24) (Osborne et al. 2006, Li e Mira de Orduña 2010, Jackowetz et al. 2011, Pan et al. 2011, Jackowetz et al. 2011-3, [http://www.oenodev.com/elevage\\_oxygene\\_vin.asp](http://www.oenodev.com/elevage_oxygene_vin.asp)).

Um aumento de acetaldeído tem sido observado na fase mais avançada da micro-oxigenação regular (Carlton et al. 2007).

Aldeídos, especialmente nos vinhos tintos, poderão participar em importantes reações dado que participam na formação de pontes etílicas de compostos, as quais são importantes para a estabilização da cor em vinhos tintos (Timberlake e Bridle 1976, Fulcrand et al. 1996, Saucier et al. 1997).



**Figura 26** - Polimerização taninos-antocianinas mediados pela ponte acetaldeído (adaptado de oenodev.com).

Contudo, em estudos mais recentes, tem sido demonstrado que os compostos formados pelas pontes etílicas são instáveis e a sua desagregação poderá originar novos compostos.

Por outro lado, as reações de cicloadição entre antocianinas e outras pequenas moléculas podem formar uma nova família de pigmentos derivados de antocianinas – piranoantocianinas. Especificamente, a reação com o ácido pirúvico ou etanal origina vitisinas A e B respetivamente (Bakker e Timberlake 1997, Fulcrand et al. 1998, Vivar-Quintana et al. 1999, Mateus et al. 2001). Além disso, a reação entre antocianinas e vinilfenol pode formar aductos vinilfenol (Fulcrand et al. 1996, Schwarz et al. 2003), e os compostos previamente formados através das pontes etilideno podem ser dissociadas e originar também aductos vinilfenol (Es-Safi et al. 1999, Cruz et al. 2008).

Todas estas reações resultam numa mudança gradual da cor do vinho, de vermelho púrpura a vermelho acastanhado. A adstringência também diminui, no entanto o mecanismo que descreve este facto não está muito claro. Teoricamente, a formação de pontes etil poderá aumentar o grau de polimerização de flavanóis, que consequentemente poderá diminuir a adstringência (Vidal et al. 2003).

Há também a possibilidade da oxigenação promover o crescimento de microorganismos aeróbicos. A bactéria ácido-acética (AAB), a bactéria ácido-lática (LAB) e *Dekkera/Brettanomyces* são os organismos aeróbicos mais importantes no processo de vinificação (Paul 2002, du Toit et al. 2006).

## 6.2. Bactéria ácido-acética

As bactérias ácido-acéticas (AAB) são organismos ubíquos e que estão bem adaptados a meios ricos em açúcar e etanol. Esta família de bactérias Gram-positivas, são bem conhecidas pela sua habilidade de produzir ácido acético, o maior constituinte do vinagre (Bartowsky e Henschke 2008). As duas espécies de *Acetobacter* mais frequentemente isoladas no vinho são *Acetobacter aceti* e *Acetobacter pasteurianus*. Recentemente foram isoladas novas espécies: - *Acetobacter oeni* em vinho tinto da região Dão (Silva et al. 2006); - *Acetobacter tropicallis* num vinho Austríaco (fermentação espontânea seguindo-se fermentação acética) (Silhavy e Mandl 2006).

Vinhos contaminados com AAB tem volatilidade característica, no palato a acidez do vinagre e aromas de acético, solvente, maçã alterada, noz e frequentemente uma redução no aroma frutado (Bartowsky et al. 2003). Estes vinhos possuem um baixo valor comercial, mas em alguns casos poderá ser minimizado efectuando lotes ou usando o processo osmose-reversa com o intuito de diminuir o conteúdo de ácido acético do vinho.

As uvas e os vinhos estão sujeitos a contaminação por AAB em várias etapas durante o processo de vinificação (Drysdale e Fleet 1988). O crescimento da AAB poderá ocorrer em mostos ou no decurso da fermentação se expostos ao ar. No entanto, a maioria dos problemas surgem apenas durante a conservação e estágio dos vinhos quando expostos ao ar intencionalmente (Joyeux et al. 1984a).

O ácido acético é produzido em baixas concentrações, usualmente abaixo do limiar de deteção, pelas leveduras durante a AF e pela LAB durante a MLF (Henixk-Kling 1988, Eglinton e Henschke 1999b), contudo as concentrações poderão aumentar devido ao metabolismo das bactérias ácido-láticas e ácido-acéticas.

AAB produz ácido acético através do metabolismo do etanol a acetaldeído (alcoól desidrogenase) e do acetaldeído a ácido acético (acetaldeído desidrogenase) (Adachi et al.

1978, Adachi et al. 1980, Ameyama et al. 1981, Adachi et al. 1987, Fukaya et al. 1989, Tayama et al. 1989,). O intermediário acetaldeído pode também contribuir para o aroma do vinho (Francis e Newton 2005), tal como descrito anteriormente.

Ácido acético, acetaldeído e acetato de etilo, são os compostos produzidos pela AAB mais comuns no vinho.

A prevenção da proliferação da AAB baseia-se no conhecimento que esta bactéria é aeróbica – requer oxigénio para o seu crescimento. Tal crescimento poderá ser prevenido usando práticas tais como usar um gás inerte tal como o dióxido de carbono, e assegurar que as cubas de conservação e estágio estão cheias, minimizando o contacto com o ar. No entanto, é evidente que esta bactéria poderá sobreviver e mesmo multiplicar-se (lentamente) em meios semi-anaeróbios, tal como o caso de vinhos em cubas e barricas (Joyeux et al. 1984a, Drysdale e Fleet 1988). Apesar do SO<sub>2</sub> possuir propriedades anti-microbianas, a sua concentração normalmente usada no processo de vinificação, parece não ser suficiente para o controlo do crescimento da AAB (Peynaud 1984). AAB desenvolve-se na presença de 25 mg/L de SO<sub>2</sub> livre e pelo menos 100 mg/L de SO<sub>2</sub> total é necessário para controlar o crescimento de AAB (Joyeux et al. 1984b, Watanabe e Tino 1984). Um estudo recente demonstra que concentrações baixas de SO<sub>2</sub> (0,35 mg/L de SO<sub>2</sub> molecular) têm um efeito mínimo na viabilidade e desenvolvimento de *Acetobacter pasteurianus*, enquanto que altas concentrações foram efetivas (1,2 mg/L de SO<sub>2</sub> molecular, equivalente a 75 mg/L SO<sub>2</sub> livre a pH=3,6) (Du Toit et al. 2005), o que está de acordo com a informação que é necessário 0,8 mg/L de SO<sub>2</sub> molecular para prevenir o crescimento de *Acetobacter aceti* no vinho.

Ainda mais indesejável para a indústria vinícola é a sobrevivência e proliferação da AAB em vinho engarrafado, um aspeto ainda pouco estudado.

### 6.3. O “amanteigado” - atributo indesejável no vinho

A dicetona (CH<sub>3</sub>-CO-CO-CH<sub>3</sub>), butan-2,3-diona, ou diacetil, é o composto mais conhecido como sendo o responsável pelo aroma e sabor característicos a manteiga (Van Neil et al. 1929).

O diacetil é o metabolito principal, com sabor, produzido pela família da LAB incluindo *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Oenococcus*. *Oenococcus oeni* desenvolve-se durante a MLF – biodesacidificação do vinho durante a qual ocorre o metabolismo do diacetil. O diacetil é responsável pelo aroma e sabor amanteigado de muitos alimentos e bebidas fermentadas. A biossíntese do diacetil é dependente do metabolismo do ácido cítrico e é um metabolito intermediário que poderá ser reduzido a

Diagrama de síntesis de butanol a partir de ácido cítrico:

- Ácido cítrico (1) → Ácido acético
- Ácido oxaloacético (12) → Ácido aspártico
- Ácido láctico (8) → Ácido pirúvico (liberando NADH)
- Ácido pirúvico (9) → Acetilfosfato (liberando ATP)
- Acetilfosfato (10) → Ácido acético
- Ácido pirúvico (3) → Acetaldeído-TTP (liberando CO<sub>2</sub>)
- Acetaldeído-TTP (4) → Ácido α-acetoláctico
- Ácido α-acetoláctico (5) → Acetoína (liberando CO<sub>2</sub>)
- Acetoína (6) → Diacetil (liberando NAD(P)H)
- Diacetil (11) → Acetoína (liberando CO<sub>2</sub>)
- Acetoína (7) → Butan-2,3-diol (liberando NAD(P)H)

O ácido pirúvico deriva essencialmente do metabolismo dos açúcares e do ácido cítrico, e a formação do butan-2,3-diol poderá contribuir para o balanço redox do metabolismo celular. Teoricamente, 1 mol de citrato produz 1 mol de ácido acético, 2 mol de dióxido de carbono e 0,5 mol de (diacetil + acetoína e butan-2,3-diol) (Seitz et al. 1963, Speckman e Collins 1968, Cogan 1987, Ramos et al. 1995, Ramos e Santos 1996).

As leveduras contribuem também para o conteúdo de diacetil no vinho, mas devido às condições altamente redutoras no final da AF, a concentração de diacetil é usualmente mais baixa que o limiar de deteção (Martineau et al. 1995a). Esta redução do diacetil a acetoína e butan-2,3-diol é vantajosa para a levedura, porque os produtos obtidos são menos tóxicos que o diacetil e a redução aumenta os níveis de co-enzimas NAD e NADP (De Revel e

Bertrand 1994). O diacetil é um produto instável e tal como outros compostos carbonilo, tais como acetaldeído, é reduzido ao seu álcool correspondente, neste caso butan-2,3-diol. Esta habilidade de utilização do diacetil por *Oenococcus oeni* tem sido demonstrado em diversos estudos (Postel e Meier 1983, Martineau e Henick-Kling 1995a). A acetoína e o butan-2,3-diol não contribuem para o sabor do vinho devido aos seus altos valores de limiar de deteção (aproximadamente 150 e 600 mg/L, respetivamente) (Bertrand et al. 1984). A sua formação é encorajada pela presença contínua das bactérias ou leveduras durante a degradação do ácido málico. Portanto, a concentração de diacetil no vinho, depende da razão da sua formação em relação à sua redução completa a álcool, butan-2,3-diol. A concentração de diacetil, e consequentemente o atributo “amanteigado”, poderá ser visto como instável quando microorganismos estão presentes.

*Oenococcus oeni*, anteriormente *Leuconostoc oenos* (Dicks et al. 1995), é a espécie preferida para induzir MLF nos vinhos, dado que está mais bem adaptada para sobreviver nas difíceis condições de baixo pH e alto teor alcoólico do vinho (Wibowo et al. 1985).

O limiar de perceção a nível do sabor para o diacetil é dependente do vinho e poderá variar desde 0,2 mg/L para Chardonnay, 0,9 mg/L para Pinot Noir a 2,8 mg/L para Cabernet Sauvignon (Martineau et al. 1995a). A perceção sensorial do diacetil no vinho é também dependente da presença de outros compostos presentes no vinho (Bartowsky et al. 2002a,b).

### **6.3.1 Controlo potencial do crescimento da bactéria ácido-lática pelos compostos fenólicos**

Os polifenóis são componentes naturais no mosto e no vinho e podem afetar potencialmente o crescimento da LAB e a AF. Em estudos recentes, os efeitos de alguns compostos fenólicos (maioritariamente ácidos fenólicos e seus ésteres e alguns flavonóis, tais como catequinas) em algumas espécies de bactérias ácido-láticas, revelam que estes compostos em concentrações iguais às presentes nos vinhos, estimulam o crescimento bacteriológico (Campos et al. 2003, Rozès et al. 2003). Uma possível explicação para os efeitos destes compostos, é que estes servem de substratos para a bactéria. De facto, o trabalho desenvolvido por Hernández et al. (2007) e por Alberto et al. (2001), demonstra que alguns ácidos hidroxicinâmicos assim como os seus ésteres são metabolizados durante a fase de crescimento de algumas espécies de LAB. Em contrapartida, a grandes concentrações, os compostos fenólicos são tóxicos, o que poderá causar inibição do seu crescimento (Stead 1993, Reguant et al. 2000). O estímulo ou inibição do crescimento da

LAB devido à presença de alguns compostos fenólicos, levam os investigadores a considerar a possibilidade do seu uso como agentes naturais anti-microbianos durante o processo de vinificação.

Como dito anteriormente, a eficácia dos compostos fenólicos como agentes anti-microbianos contra a LAB no vinho é dependente da estrutura dos compostos e da sua concentração. Em geral, o efeito anti-microbiano ocorre a doses mais elevadas das que ocorrem nos vinhos. Contudo, deve-se considerar que a aplicação de extratos fenólicos como agentes anti-microbianos nos vinhos poderão ser condicionados por possíveis alterações que as possíveis concentrações efetivas provocam nas propriedades físico-químicas (solubilidade) e organoléticas (cor e aroma) no vinho. Contudo, há que ter em consideração que estes estudos foram conduzidos em meios de cultura, em que o desenvolvimento microbiano é favorecido pelas condições do meio (substrato e pH). Por esse motivo, a concentração de compostos fenólicos necessária para inibir o crescimento bacteriano é menor em meio adverso tal como o vinho (Stead 1993). Por outro lado, a atividade anti-microbiana dos compostos fenólicos poderá aumentar devido aos efeitos de interação entre eles ou outros agentes anti-microbianos, tais como SO<sub>2</sub>, permitindo reduzir a dose de cada um deles. Finalmente, há que ter em consideração a presença de outros compostos, tais como proteínas, açúcares ou oxidantes, poderão interagir afetando a sua atividade (García-Ruiz et al. 2007).

#### **6.4. *Dekkera/Brettanomyces***

Leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces* são bem conhecidas por estarem envolvidas na produção de fenóis voláteis (4-etilfenol e 4-etilguaiaicol) proporcionando aromas ao vinho, usualmente descritos como “suor de cavalo”, “couro”, “animal” (Heresztyn 1986, Chatonnet et al. 1995, Edlin et al. 1995, Chatonnet et al. 1997). Existem cinco espécies pertencentes ao género *Brettanomyces/Dekkera*: - *Brettanomyces custersianus*, *Brettanomyces naardenensis*, *Brettanomyces nanus*, *Brettanomyces anomalus*, e *Brettanomyces bruxellensis* (Kurtzman e Fell 2000).

A *Brettanomyces bruxellensis* é a mais comum no vinho - leveduras indígenas encontradas à superfície das uvas e barricas. A transformação dos ácidos hidroxicinâmicos, ácido p-cumárico e ácido ferúlico, em fenóis voláteis é predominantemente associada à atividade de leveduras do género *Brettanomyces* e à sua forma ascosporógena classificada como *Dekkera* (Heresztyn 1986, Chatonnet et al. 1995, Edlin et al. 1995).



Os precursores dos fenóis voláteis são constituintes naturais dos mostos e vinhos – ácidos hidroxicinâmicos - p-cumárico e ferúlico (Heresztyn 1986, Chatonnet et al. 1995). A conversão destes ácidos fenólicos envolve a atividade sequencial de duas enzimas: a primeira é a cinamato descarboxilase que descarboxila o ácido hidroxicinâmico no correspondente vinilfenol (4-vinilfenol do ácido p-cumárico ou 4-vinilguaicol do ácido ferúlico), e a segunda é a vinilfenol redutase que reduz o vinilfenol no correspondente etilfenol (4-etilfenol do 4-vinilfenol e 4-etilguaicol do 4-vinilguaicol) (Heresztyn 1986, Chatonnet et al. 1992).

Vinhos brancos contaminados com fenóis voláteis normalmente contêm quantidades variáveis de vinilfenóis, razão de 1:1 de 4-vinilfenol/4-vinilguaicol, mas geralmente não contêm etilfenóis. Por outro lado, vinhos tintos contaminados contêm pequenas quantidades de vinilfenóis mas possuem quantidades consideráveis de etilfenóis numa razão de 8:1 de 4-etilfenol/4-etilguaicol (Chatonnet et al. 1992, Ribéreu-Gayon et al. 2000).

A presença dos aromas característicos atrás referidos, poderá ser considerada positiva ou negativa, dependendo da concentração e da expectativa de um determinado vinho. A baixas concentrações estes compostos poderão contribuir para a complexidade aromática do vinho (<420 µg/L de uma mistura de 4-etilfenol e 4-etilguaicol) (Chatonnet et al. 1995, Ribéreu-Gayon et al. 2000, Fugelsang e Edwards 2007), no entanto, altas concentrações poderão oprimir o aroma do vinho, criando uma experiência desagradável ao consumidor (Chatonnet e Pons 1990). A qualidade dos vinhos contendo estes aromas é controversa, uma vez que está dependente de preferências individuais e culturais.

*Dekkera/Brettanomyces* são reconhecidos como os principais organismos responsáveis pela produção de fenóis voláteis, no entanto alguns estudos têm demonstrado que algumas estirpes de LAB são também capazes de produzir fenóis voláteis (Heresztyn 1986).

*Brettanomyces* poderá desenvolver-se mesmo em meios anaeróbicos, mas o seu crescimento é favorecido com a presença de oxigénio. Contudo, doses pequenas de oxigénio parecem não ser relevantes para o seu rápido crescimento, sendo o seu desenvolvimento rápido apenas encorajado com doses excessivas (du Toit et al. 2006). De facto, a oxigenação durante a vinificação, como trasfegas ou macro-oxigenações do mosto (remontagens), constituem maior risco de favorecimento do crescimento de *Brettanomyces*. O risco de contaminação é maior nas operações de trasfega e bombeamento do vinho.

Vinhos tintos são particularmente suscetíveis a *Brettanomyces bruxellensis* devido à sua baixa acidez, elevado conteúdo de polifenóis e envelhecimento em barricas.

*Brettanomyces bruxellensis* poderá estar presente em todas as etapas da vinificação, e poderá permanecer como viável mas não culturável (VNC) ou em estado dormente por

longos períodos de tempo. Metabolitos voláteis poderão estar presentes mesmo quando as células são indetetáveis ou minimamente detetáveis (Arvik e Henick-Kling 2002, Romano et al. 2008).

Estudos recentes têm demonstrado que *Brettanomyces bruxellensis* não é o único organismo a formar 4-etilfenol e 4-etilguaiaicol. 37% de LAB testada poderá produzir fenóis voláteis a partir do ácido p-cumárico e 9% poderá formar 4-etilfenol (Couto et al. 2006).

Os limites de percepção para 4-etilfenol e 4-etilguaiaicol no vinho tinto, são 605 µg/L e 100 µg/L, respetivamente (Chatonnet et al. 1992). Quando ambos os compostos estão presentes no vinho tinto, o limiar de percepção para 4-etilfenol é reduzido. A percepção sensorial destes compostos pode ser afetada pela presença de outros compostos. Num vinho tinto de média estrutura, com presença de alguma madeira, o limiar de percepção de 4-etilfenol pode ser 350 µg/L em oposição a 1000 µg/L num vinho bem estruturado com carácter mais amadeirado (Coulter et al. 2003).

Baixo pH ( $\leq 3,5$ ), níveis de SO<sub>2</sub> apropriado (0,8 ppm forma molecular) e temperaturas de estágio e envelhecimento baixas (10 - 15°C) são as práticas essenciais que poderão ser usadas para limitar a atividade de *Dekkera/Brettanomyces* nos vinhos (Du Toit e Pretorius 2000).

Para se verificar a presença destes microorganismos é necessário inocular as amostras em estudo. Semear ou inocular significa introduzir artificialmente uma quantidade de amostra (inóculo) num meio de cultura adequado, com a finalidade de iniciar um cultivo microbiano. Após a inoculação, o meio de cultura é incubado a uma temperatura adequada para o crescimento, neste caso é de 30°C.

Alguns procedimentos são indispensáveis para deteção e quantificação de diferentes microorganismos. Estas técnicas exigem condições de assepsia e segurança para evitar a contaminação dos meios de cultura com microorganismos do ambiente, para obter culturas puras evitando contaminações laboratoriais (De Mendonça e Nascimento).

## Enquadramento temático

A Ramos Pinto, empresa do setor vitivinícola, foca-se essencialmente na produção de vinhos de gama alta. Tendo em conta apenas os vinhos de mesa tintos, que resultam de lotes, é de referir que para a obtenção da qualidade pretendida, além da matéria-prima ser de boa qualidade e de o processo de vinificação decorrer sem problemas, o vinho fica em estágio por um tempo determinado, consoante o lote final. Este poderá ser em cubas inox, tonéis ou barricas, tendo diferentes evoluções físico-químicas e organoléticas ao longo do estágio, refletindo-se posteriormente no vinho apresentado ao consumidor.

Este estudo resulta de um ensaio feito com o lote da gama *Duas Quintas* Tinto de 2012. O propósito deste estudo, incide na procura de uma estratégia para minimizar o efeito do envelhecimento em cubas inox, simulando na medida do possível, o envelhecimento clássico em madeira (barrica ou tonel). A experiência dos enólogos da empresa, tem demonstrado que o envelhecimento em madeira é o mais adequado para os seus vinhos, sendo que os vinhos envelhecidos em cubas inox durante dois invernos, apresentam-se mais metálicos e menos elegantes. Por isso, os enólogos consideram que a incorporação de pequenas doses de oxigénio, elimina o carácter redutor do vinho que permanece em inox e proporciona elegância – taninos mais polidos, amplitude em boca, aroma expressivo. Não se trata de corrigir um vinho adstringente, com taninos secantes, ou muito redutor. Trata-se sim, de um efeito de refinamento que tem o envelhecimento em cascos ou tonéis.

As quantidades de oxigénio usadas foram escolhidas tendo em consideração experiências de anos anteriores, assim como o efeito discreto procurado e as operações efetuadas (trasfegas, uso de aduelas com micro-oxigenação ou apenas micro-oxigenação).

Com este estudo pretende-se analisar a influência do oxigénio na sua composição em polifenóis, polissacáridos, compostos voláteis, microorganismos aeróbicos e características organoléticas nos diferentes ensaios, tendo como referências o ensaio Inox como ponto de partida, e o ensaio lote como objetivo a atingir. Pretende-se perceber as evoluções ocorridas nos ensaios sujeitos a diferentes condições.

## Objetivo

Perante o que foi introduzido acerca da MO e efeitos decorrentes da sua aplicação durante o estágio e envelhecimento de vinhos tintos, surgem algumas questões pertinentes sobre qual o comportamento de um vinho Duriense quando sujeito a esta técnica após MLF.

Os estudos citados anteriormente sobre MO, ocorrem maioritariamente em pequenos volumes e realizados com vinhos com características bem distintas de um vinho do Douro. Desta forma, surge este estudo com um vinho com determinadas características que correspondem especificamente a uma vindima (ano), vinificado com castas autóctones do Douro, com um processo de vinificação bem definido, com composição fenólica específica e com volume em grande escala, pretendendo-se saber qual a evolução deste vinho quando sujeito a diferentes condições de MO.

O principal objetivo deste trabalho incide no estudo do efeito da MO a diferentes concentrações de oxigénio por um período de seis meses (Testemunho, 0,5 mg/L/mês, 1,0 mg/L/mês, 1,0 mg/L/mês + 0,5 mg/L/mês + aduelas) e o lote final, a fim de se verificar qual a evolução na composição fenólica dos diferentes ensaios, assim como alterações a nível microbiológico e sensorial de um vinho tinto D.O.P. da Região Demarcada do Douro.

## Palavras-chave

Vinho tinto, compostos fenólicos, oxidação, micro-oxigenação, aduelas, barricas, compostos voláteis.

## Keywords

Red wine, phenolic compounds, oxidation, micro-oxygenation, staves, wood barrels, volatile compounds.

## Material e métodos

Para este estudo, os enólogos responsáveis fizeram um ensaio de modo a perceberem qual a melhor opção para o estágio dos seus vinhos, uma vez que nem todo o volume passa por madeira. Após o loteamento final, aquando término da MLF, separou-se o vinho para 4 cubas de 15 500 L, sujeitos a diferentes condições:

**-INOX (Testemunho)** – Cuba Inox, sem qualquer incorporação de oxigénio ou madeira;

**-Inox 0.5 mg/L/mês** – Cuba Inox, com micro-oxigenação 0,5 mg/L/mês durante 6 meses;

**-Inox 1.0 mg/L/mês** – Cuba Inox, com micro-oxigenação 1,0 mg/L/mês durante 6 meses;

**-Aduelas + 1.0 + 0.5 mg/L/mês** – Cuba Inox, com micro-oxigenação 1,0 mg/L/mês durante 3 meses + 0,5 mg/L/mês durante 3 meses. Aduelas de carvalho francês, 75% tosta média e 25% tosta média alta, 18 mm. A dose usada é de 1 aduela/hL (sem recomendação do fornecedor).

**-Blend** – Amostra após blend de todos os vinhos constituintes do lote final, pronto a ir para o mercado. Os ensaios em estudo representam 17% do blend final. Blend final é constituído por 50% inox (incluído o ensaio), 30% tonéis e cubas com aduelas e 20% em barricas.

Foi feita uma análise por garrafa, havendo repetibilidade de leituras - três leituras por análise, excetuando a análise do teor em polissacáridos que foi efetuada em quintuplicado.

### 1. Estudo da composição polifenólica dos vinhos

#### 1.1. Índice de fenóis totais

Este método de análise, consiste na capacidade dos anéis benzénicos absorverem radiação na região do ultra-violeta, tendo um máximo de absorção a 280 nm.

Na determinação do índice de fenóis totais, as medições de absorvância foram realizadas no espectrofotómetro de feixe duplo UV/Vis Shimadzu 265 , tendo-se utilizado células de quartzo de percurso ótico de 10 mm.

Procedeu-se a uma diluição dos vinhos em estudo de 1:100 ( 1,00 mL de vinho em 100,00 mL de solução sintética água/etanol 12% (V/V) com 5,0 g/L de ácido tartárico a pH =

3,25). Fixou-se o comprimento de onda a 280 nm, mediu-se a absorvância das amostras em estudo, utilizando água desionizada como branco.

O índice de fenóis totais (IFT) é calculado pela expressão:

$$\text{IFT} = \text{Abs}_{280 \text{ nm}} * \text{factor diluição}$$

## 1.2. Taninos proantociânicos totais

A determinação de taninos proantociânicos totais dos vinhos em análise, baseia-se na reação de hidrólise dos taninos condensados (procianidinas e prodelfinidinas que são compostos incolores) que em meio ácido e por ação do calor formam compostos corados – antocianidinas, segundo o métodos descrito na literatura (Darné 1991, Ribéreau e Stonestreet 1996).

Começou-se por diluir o vinho numa proporção de 1:50 ( 1,00 mL de vinho em 50,00 mL solução sintética água/etanol 12% (V/V) com 5,0 g/L de ácido tartárico a pH = 3,25). De seguida, para um tubo de hidrólise, adicionou-se 4,00 mL da solução diluída de vinho, 6,00 mL de HCl 37% e 2,00 mL de água desionizada. O HCl 37% foi adicionado em último lugar para assegurar que a decomposição dos taninos apenas se iniciasse aquando o aquecimento das soluções. Os tubos foram rolhados e aquecidos em banho-maria a 100 °C durante 30 minutos. Ao mesmo tempo, preparou-se a solução referência para cada ensaio, com a mesma composição das anteriores mas sem se levar ao aquecimento. Após hidrólise, arrefeceram-se os tubos, colocando-os em água fria e ao abrigo da luz. Passados 10 minutos, retiraram-se os tubos da água fria e foram imediatamente cobertos com papel alumínio de modo a manterem-se ao abrigo da luz. A cada tubo de ensaio, adicionou-se 1,00 mL de etanol para estabilizar a cor das antocianinas sendo depois agitados num Vortex. De seguida, mediu-se a absorvância de todas as soluções aquecidas resultantes da reação de hidrólise Bate-Smith e das soluções de referência a um comprimento de onda fixo de 520 nm (correspondendo ao comprimento de onda da zona do visível que os compostos resultantes da reação de hidrólise possuem o máximo de absorvância.)

Mediu-se a absorvância de cada ensaio a 520 nm, utilizando um espectrofotómetro UV/Vis Shimadzu 265 e células de vidro de percurso óptico de 10 mm.

O valor da absorvância é calculado de cada ensaio é obtido através da subtração do valor da absorvância para cada ensaio pelo valor da absorvância da solução de referência:

$$\Delta\text{Abs} = \text{Abs amostra} - \text{Abs referência}$$

Para se obter o teor em taninos proantociânicos totais nos vinhos, utiliza-se a reta de calibração obtida a partir de soluções-padrão:

$$\Delta\text{Abs} = 0,0456 * |\text{Taninos}| \text{ (g/L)} + 0,0178$$

### 1.3. Poder tanante

O poder tanante é determinado por nefelometria, tendo como base o procedimento descrito por De Freitas (1995). É caracterizado pela capacidade que alguns compostos polifenólicos possuem, nomeadamente os taninos, de formar agregados insolúveis com as proteínas.

Diluiu-se o vinho numa proporção de 1:50 (1,00 mL de vinho em 50 mL solução sintética água/etanol 12% (V/V) com 5,0 g/L de ácido tartárico a pH = 3,25, previamente filtrado (0,45 µm)).

Pipetou-se 4,00 mL desta solução para 4 tubos de ensaio que são agitados num Vórtex e efetuou-se a leitura da turbidez (ensaio branco) num Turbidímetro HACH 2100 N equipado com um adaptador de células de 100 x 12 mm.

Após leitura, adicionou-se 150 µL de solução aquosa de proteína albumina sérica bovina (BSA) 0,8 g/L a cada amostra, tendo-se agitado os tubos no vórtex e guardados à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 30 minutos.

Decorridos os 30 minutos, efetuaram-se as leituras dos valores de turbidez máximo. O poder tanante dos vinhos é expresso em unidades de turbidez (NTU) por mL de vinho, de acordo com a seguinte expressão:

$$\text{Turbidez} \left( \frac{\text{NTU}}{\text{mL}} \text{ de vinho} \right) = \frac{\text{Turbidez amostra} - \text{Turbidez branco}}{0,08}$$

### 1.4. Índice de diálise

Esta determinação dá-nos a indicação da complexidade estrutural dos compostos polifenólicos existentes no vinho. O procedimento tem como base o protocolo referido por Glories (1978).

Colocou-se 5,00 mL de vinho numa membrana de diálise com 25 cm de comprimento (celulose 6 mm d.i. cut off 12 000 – 16 000; raio dos poros 25 Å). De seguida, introduziu-se a membrana num frasco de vidro com 50,0 mL de solução modelo de vinho água/etanol 12% (V/V) com 5,0 g/L de ácido tartárico a pH igual a 3,25.

Num outro frasco, que será a referência, colocou-se 50,0 mL de solução modelo de vinho água/etanol 12% (V/V) com 5,0 g/L de ácido tartárico a pH igual a 3,25, e 5,00 mL de vinho.

Os frascos foram fechados e mantidos ao abrigo da luz durante 24 horas, ao fim das quais fizeram-se as medições das soluções, à absorvância de 280 nm num espectrofotómetro UV/VIS Shimadzu 265 de feixe duplo, utilizando-se células de quartzo de percurso ótico de 10 mm. Foi necessário realizar uma diluição de 1:100, tanto para os ensaios branco e os ensaios amostra para realizar as medições.

O índice de diálise foi calculado através da expressão:

$$I. D. = \frac{d_0 - d}{d_0} * \text{factor diluição}$$

## **1.5. Análise da cor**

### **1.5.1. Índice de cor vermelha**

Para a determinação do índice de cor vermelha, foi utilizado um espectrofotómetro UV/VIS Shimadzu 265 de feixe duplo e células de vidro de percurso ótico de 1 mm. As leituras foram efetuadas a um comprimento de onda de 520 nm, dado que corresponde ao valor máximo de absorvância das antocianinas.

O índice de cor vermelha é dado pela seguinte expressão:

$$ICV = Abs (520 \text{ nm})$$

### **1.5.2. Intensidade corante**

A determinação da intensidade corante foi efetuada da mesma forma que o índice de cor vermelha, tendo em conta que neste caso, foram registadas os valores de absorvância a 420 nm e 620 nm, usando-se células de percurso ótico de 1 mm.



Sabendo que, apesar de as antocianinas terem um máximo de absorvância a 520 nm , não se pode excluir, para o cálculo da intensidade corante, o contributo das formas quinonas das antocianinas livres e combinadas, sendo por isso necessário considerar as regiões dos azuis (620 nm). A zona a 420 nm, região dos amarelos e castanhos, é também considerada pelo facto de que, com o passar do tempo, as antocianinas deixam de ter uma máxima absorvância a 520 nm e passam a ter uma maior absorvância precisamente na zona a 420 nm.

A intensidade corante foi calculada através da soma dessas mesmas absorvâncias:

$$IC = Abs (420 \text{ nm}) + Abs (520 \text{ nm}) + Abs (620 \text{ nm})$$

### 1.5.3. Tonalidade

A tonalidade de um vinho indica aproximadamente o seu grau de evolução e maturidade.

A determinação da tonalidade foi realizada de igual modo que a determinação da intensidade corante, no entanto, registaram-se apenas os valores de absorvância a 420 nm e 520 nm, tendo-se usado células de percurso ótico de 1 mm.

A tonalidade foi calculada pela expressão:

$$Ton = \frac{420 \text{ nm}}{520 \text{ nm}}$$

**Tabela 1** : Fórmulas usadas no cálculo dos índices colorimétricos segundo Sudraud (1958) e Glories (1984)

Índice	Fórmula
<b>Intensidade Corante (IC)</b>	<b>IC</b> =(Abs <sub>420</sub> + Abs <sub>520</sub> + Abs <sub>620</sub> )
<b>% Amarelo</b>	<b>% Am</b> = (Abs <sub>420</sub> /IC) x 100
<b>% Vermelho</b>	<b>% Verm</b> = (Abs <sub>520</sub> /IC) x 100
<b>% Azul</b>	<b>% Azul</b> = (Abs <sub>620</sub> /IC) x 100

#### **1.5.4. Antocianinas livres totais**

A concentração de antocianinas livres totais presentes no vinho, foi determinada através de uma adaptação do método do bissulfito descrito por Sommers et Evans (1976).

Colocou-se num matraz 41,00 mL de HCl 2%, 2,00 mL de EtOH e 1,00 mL de cada amostra de vinho em análise. Para cada um dos tubos de ensaio, pipetou-se 10,00 mL da solução preparada anteriormente, e 4,00 mL de bissulfito de sódio 20%. Num quarto tubo de ensaio, preparou-se a solução de referência. Para tal, pipetou-se 10,00 mL da solução inicial e adicionou-se 4,00 mL de água desionizada.

De seguida, todos os tubos foram agitados no Vórtex e colocados ao abrigo da luz durante 20 minutos. Após este tempo, realizou-se a medição da absorvância das soluções a 520 nm, utilizando-se células de vidro com um percurso ótico de 10 mm, num espectrofotómetro UV/VIS Shimadzu 265 de feixe duplo.

A quantidade de antocianinas livres que reage, foi determinada através da diferença entre a absorvância da solução de referência e a absorvância das amostras:

$$\Delta\text{Abs} = \text{Abs amostra} - \text{Abs referência}$$

A concentração de antocianinas livres totais presente em cada amostra de vinho, foi determinada utilizando a reta de calibração obtida previamente a partir de uma solução padrão de 3-glucósido de malvidina:

$$\Delta\text{Abs} = 0,0015 * |\text{Antocianinas}| \text{ (mg/L)} + 0,0024$$

#### **1.5.5. Antocianinas 3-monoglucósidas livres**

As amostras de vinho foram analisadas diretamente e em triplicado por HPLC (Merck Ref. L-7100) equipado com um detetor UV-VIS (Merck L-7420 A) por injeção direta de 20 µL de amostra, numa coluna Merck de fase reversa C18 ODS (250 x 4,6 mm d.i.) segundo o método descrito por Roggero et al. (1987).

Foram usados dois solventes: Solvente A – H<sub>2</sub>O/HCOOH 10% (v/v); Solvente B – H<sub>2</sub>O/HCOOH 10% (v/v) / ACN 30% (v/v). Todos os cromatogramas foram obtidos a um comprimento de onda de 520 nm, a 25°C (temperatura do forno), com um fluxo de 1,0 mL/min e segundo o gradiente de eluição:

**Tabela 2** : Gradiente de eluição utilizado na análise de antocianidinas 3-monoglucosídicas totais

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	80	20
70	15	85
75	0	100
85	0	100
90	80	20

A concentração das diferentes antocianidinas foi calculada a partir da reta de calibração obtida por injeção direta de diferentes concentrações de malvidina 3-glucósido.

$$\text{Malvidina 3-glucósido (mg/L)} = \frac{(\text{Área} + 763492,5345)}{134922,2417}$$

## 2. pH

A determinação do pH é uma das mais comuns e importantes determinações no contexto da química do vinho.

O sistema medidor de pH ou pH-metro consiste de um potenciômetro (aparelho medidor de diferença de potencial), um eletrodo de vidro, um eletrodo de referência e um sensor de compensação de temperatura.

Realizou-se a medição do pH dos ensaios em estudo aquando a abertura das amostras para a realização das restantes análises, utilizando-se um potenciômetro Modelo WHW 320.

## 3. Teste de estabilidade oxidativa em vinhos tintos

Este procedimento permite determinar se um vinho tinto está estável contra oxidações. Este teste acelera o processo e identifica os vinhos instáveis e suscetíveis ao acastanhamento.

Num matraz, arejou-se cerca de 100,0 mL de amostra de vinho, agitando-se aproximadamente 2 minutos.

Colocou-se 30,0 mL do vinho arejado num copo de prova e isolou-se com Parafilm.

Num outro copo de prova, colocou-se 30,0 mL de vinho não arejado e 0,9 mL de uma solução 1000 ppm de bissulfito de sódio (30,0 mg/L). Isolou-se com Parafilm.

Colocaram-se ambos os copos na estufa a 30,0 °C durante 5 dias.

Após decorridos os 5 dias, analisaram-se as amostras como indicado:

*Estável:*

- Boa resistência à oxidação;
- Pequena alteração de cor;
- Vinho está brilhante e ainda tem bons aromas.

*Instável:*

- Baixa resistência à oxidação;
- Cor acastanhada;
- Aromas oxidados.

*Estável/Instável:*

- Alguma resistência à oxidação;
- Mudança considerável na cor;
- Vinho turvo e aromas desbotados.

## Folha de registo

### Teste de estabilidade oxidativa em vinhos tintos

Comparação de Amostras	Cor	Aroma
1 A / 1 B		
2 A / 2 B		
3 A / 3 B		
4 A / 4 B		
5 A / 5 B		

Registo dos aromas encontrados e referir em qual dos ensaios - A (ausência de sulfuroso) ou B (em presença de sulfuroso).

#### *Estável:*

- Boa resistência à oxidação;
- Pequena alteração de cor;
- Vinho está brilhante e ainda tem bons aromas.

#### *Instável:*

- Baixa resistência à oxidação;
- Cor acastanhada;
- Aromas oxidados.

#### *Estável/Instável:*

- Alguma resistência à oxidação;
- Mudança considerável na cor;
- Vinho turvo e aromas desbotados.

#### 4. Polissacáridos

A quantificação de polissacáridos presentes nos vinhos, foi determinada segundo o procedimento descrito por Ayestarán et al. (2004). Este método baseia-se na medição por nefelometria da turbidez da solução após precipitação dos polissacáridos solúveis no vinho com uma solução etanol-ácido (HCl 0.3 M), por ação da exposição a baixas temperaturas.

Filtrou-se 10 mL de cada amostra, utilizando um filtro de 0.45 µm. Seguidamente, pipetou-se 500 µL de cada amostra, à qual se adicionaram 5 volumes de uma solução etanol-ácido (HCl 0.3 M). As soluções foram colocadas a 4°C durante 18 horas. Decorrido este tempo, efetuou-se a leitura da turbidez, num turbidímetro HACH 2100 N equipado com um adaptador de células de 100 x 12 mm.

O teor de polissacáridos presentes nas amostras foi calculado utilizando uma reta de calibração obtida a partir de soluções-padrão de polissacáridos existentes no vinho:

$$[\text{Polissacáridos}] \text{ (g/L)} = \frac{\text{turbidez} - 0.085}{103.62}$$

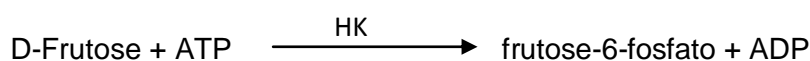
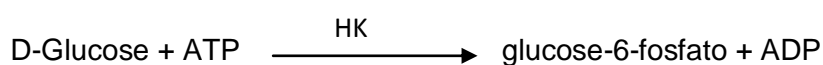
#### 5. Análises Enzimáticas

Para a execução das análises enzimáticas, recorreu-se a um equipamento específico automático – *Miura analyzer*. As análises foram executadas de acordo com os protocolos específicos, recomendados pela empresa fornecedora do equipamento, tendo como base as referências do Compêndio Internacional de Análises para vinhos e mostos (2008) e Métodos de Análises Enzimáticas da Bermeyer.

##### 5.1. Pesquisa D-Glucose + D-Fructose

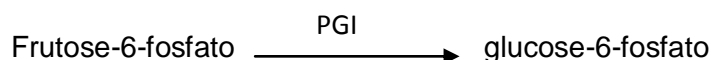
Este método enzimático baseia-se nos seguintes princípios químicos:

Hexoquinase (HK) catalisa a fosforilação de D-Glucose e D-Fructose pela reação com adenosina-5-trifosfato (ATP).

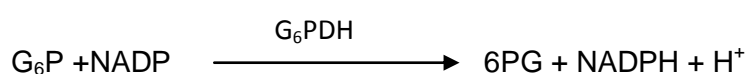


Os produtos da reação são respetivamente glucose-6-fosfato e frutose-6 fosfato, assim como adenosina difosfato (ADP).

Frutose-6-fosfato é convertido a glucose-6-fosfato na presença de fosfoglucoase isomerase (PGI).



Na presença glucose-6-fosfato dehidrogenase ( $G_6PDH$ ), glucose-6-fosfato é oxidada pela nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADP); 6-fosfogluconato (6PG) e NADPH são produtos de reação:

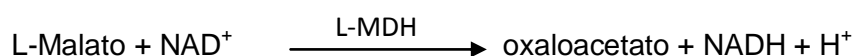


O aumento da absorvância a 340 nm devido à formação de NADPH é diretamente proporcional à concentração de D-Glucose + D-Frutose nas amostras em análise.

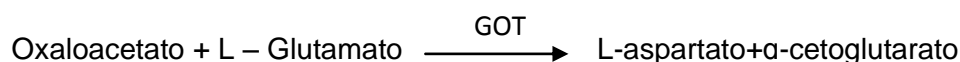
Há cuidados a ter, nomeadamente no caso de amostras gaseificadas, estas deverão ser desgaseificadas. Amostras com coloração (vinhos tintos), deverão ser descoloradas com PVPP ou carvão activado uma vez que pigmentos poderão interferir nas determinações enzimáticas.

## 5.2. *Pesquisa Ácido L-Málico*

A enzima L-malato dehidrogenase (L-MDH) catalisa a oxidação do ácido L-málico a oxaloacetato com a redução concomitante de nicotinamida adenina dinucleótido ( $NAD^+$ ).



A reação de hidrogenase é acompanhada com uma reação de amino transferência



O aumento da absorvância a 340 nm devido à formação de NADH é diretamente proporcional à concentração de ácido L-málico na amostra em análise. A remoção do oxaloacetato da reação, reajusta o equilíbrio favorecendo a oxidação do ácido málico.

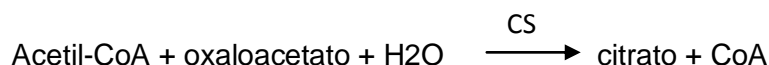
No caso de amostras gaseificadas, estas deverão ser desgaseificadas.

### 5.3. **Acidez Volátil**

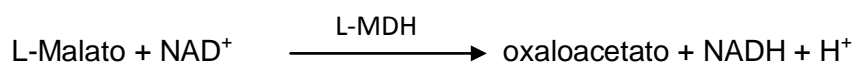
A enzima acetil-CoA sintetase (ACS) catalisa a reação do ácido acético com a coenzima A (CoA) na presença de trifosfato de adenosina, produzindo acetil-CoA.



Citrato sintase (CS) cataliza a reação do acetil-CoA e oxaloacetato para originar citrato.



O oxaloacetato, consumido nesta reação, tem origem do ácido L-málico na presença do L- malato de hidrogenase.



O aumento da absorvância a 340 nm devido à formação de NADH, é diretamente proporcional à concentração de ácido acético na amostra em análise.

O método UV-enzimático usado, mede especificamente o ácido acético.

Há a ter especial atenção que no caso de amostras gaseificadas, deverão ser desgaseificadas e amostras com coloração (vinhos tintos), deverão ser descoloradas com PVPP ou carvão ativado uma vez que pigmentos poderão interferir nas determinações enzimáticas.

## 6. **Pesquisa de *Dekkera/Brettanomyces***

Procedeu-se à quantificação dos fenóis voláteis 4-etilfenol e 4-etilguiacol pelo método GC-FID das amostras em estudo. Realizou-se também a inoculação das amostras em estudo, com o intuito de verificar a presença/ausência de *Dekkera/Brettanomyces*.

A análise dos etilfenóis foi realizada segundo o protocolo descrito por Bertrand (1981). Preparou-se uma solução de 50:50 (v/v) de éter dietílico:n-hexano (ambos da Merck, Darmstadt) misturando-os com volumes iguais de cada solvente.



Uma solução de 3-octanol, com a concentração de 8 mg/L em metanol, foi usada como padrão interno. As amostras foram centrifugadas à rotação de 4000 rpm durante 10 minutos (Centromix, Selecta). 50 mL do sobrenadante foram transferidos para um balão volumétrico de 100 mL. Foram acrescentados 50 µL da solução de padrão interno, 3-octanol. As amostras foram sucessivamente extraídas numa ampola de decantação, usando a mistura de éter dietílico e n-hexano acima descrita. Foram realizadas três extrações com adição de 4 mL, 2 mL e 2 mL da mistura dos solventes de extração. A amostra é, então, colocada em agitação durante 5 minutos após adição dos solventes.

A fase orgânica, que permanecia no topo da ampola de decantação, foi recolhida ao longo das três extrações para frascos de “headspace” e a fase inorgânica foi deixada no balão volumétrico. A fase orgânica de cada extração foi recolhida com o uso de pipetas de Pasteur e transferida para um vial de 1,50 mL, onde foram concentradas a aproximadamente metade de volume original sob uma corrente de azoto, pronto para a análise instrumental no cromatógrafo de gás CG-FID.

## CG-FID

Depois de realizada a extração, as amostras foram analisadas por Cromatografia Gasosa com um detetor de Ionização por Chama (CG-FID 5890A da Hewlett Packard). A coluna usada foi do tipo FFAP (BP1), com dimensões 50 m por 0,22 mm por 0,25 µm (SGE). Injetou-se 2 µL de amostra num injetor aquecido a 250 °C, com tempo de splitless de 0,3 min e fluxo de splitless de 30 mL/min. O gás transportador foi o hidrogénio, a um fluxo de 1 mL/min. O forno começou com uma temperatura de 40 °C no minuto inicial, seguida de um aumento de 2 °C por minuto até aos 220 °C durante 20 minutos.

## Crescimento da *Dekkera/Brettanomyces*

Para realizar a pesquisa de microorganismos, nomeadamente *Dekkera/Brettanomyces*, é necessário autoclavar o material necessário à execução deste procedimento, assim como proceder à inoculação do meio de cultura junto a uma chama.

Preparou-se 500 mL de Solução de Ringer. Para cada amostra realizaram-se 4 diluições. Preparou-se inicialmente uma solução diluída (1:10) de cada amostra com solução Ringer. A partir dessa solução, realizaram-se as diluições seguintes obtendo-se, portanto, as seguintes concentrações de cada amostra  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ , homogeneizando bem as soluções no vortex. Pipetou-se 20 µL de cada solução e inoculou-se a placa de Petri

correspondente. Espalhou-se a amostra na placa de Petri com uma pipeta de Pasteur dobrada à chama no meio de cultura YM (Yeast Malt + Agar) com ciclohexamida. De seguida, colocaram-se as placas na estufa a 30°C durante 7 dias. Decorrido este tempo, verificou-se se houve crescimento nos meios de cultura.

## **7. Análise sensorial**

As amostras em estudo foram sujeitas a uma análise sensorial do analista e alguns colegas do laboratório, tendo também em conta o parecer dos enólogos da Empresa. O painel de provadores é composto por 10 elementos – sendo 6 do sexo feminino e 4 do sexo masculino. Os copos utilizados foram os normalizados de prova (ISO 3591). As provas foram individuais e realizaram-se no laboratório. A ficha de prova utilizada encontra-se registada na página seguinte.

**Folha de registo – Análise sensorial**

Amostra \_\_\_\_\_

<b>Açúcares</b>	<b>Acidez</b>	<b>Álcool</b>	<b>Maciez</b>
___ Seco	___ Mole	___ Fraco	___ Carente
___ Suave	___ Chato	___ Pouco alcoólico	___ Macio
___ Meio-doce	___ Fresco, vivo	___ Equilibrado	___ Redondo
___ Doce	___ Áspero	___ Quente	___ Pastoso

<b>Corpo</b>	<b>Tanicidade</b>	<b>Equilíbrio</b>	<b>Final de boca</b>
___ Magro	___ Pouco tânico	___ Harmonioso	___ Muito persistente
___ Pouco encorpado	___ Equilibrado	___ Equilibrado	___ Persistente
___ Bom corpo	___ Tânico	___ Pouco desarmônico	___ Pouco persistente
___ Muito encorpado	___ Muito tânico	___ Desarmônico	___ Fugidio

**Alguma sensação desagradável?**


---



---

**Sensações finais:****Termina bem?** \_\_\_\_\_**Deixa a boca** \_\_\_ Fresca \_\_\_ Limpa \_\_\_ Enxuta \_\_\_ Árida \_\_\_ Com sabor \_\_\_\_\_**Evolução** \_\_\_ Jovem \_\_\_ Pronto \_\_\_ Ligeiramente evoluído \_\_\_ Evoluído**Observações** \_\_\_\_\_

---



---



---



---



---

## 8. Análise estatística

Neste estudo tem-se um fator em análise (concentração de oxigénio), com 5 níveis. Em cada nível do fator tem-se 5 repetições (5 garrafas). As análises foram feitas em triplicado, exceptuando a análise de polissacáridos que se efetuou em quintuplicado. Os valores foram expressos em médias aritméticas  $\pm$  desvio padrão. As diferenças estatísticas foram avaliadas através da análise de variância a um fator – ANOVA (diferenças significativas para p-values  $<0,05$ ), seguido do Teste de Tukey para comparação de médias de nível do fator, ou seja, comparação das médias das cinco garrafas por concentração de oxigénio.

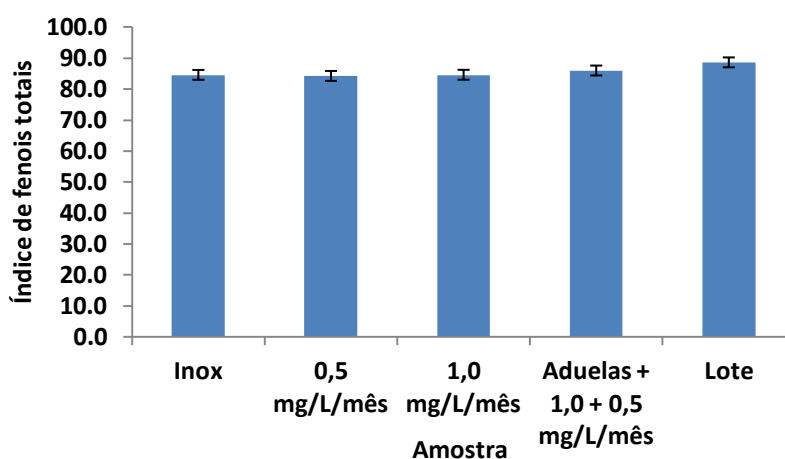
# Resultados

É de referir que, aquando a abertura das diferentes garrafas para a execução das análises, verificou-se a presença de gás na amostra Inox 1.0 mg/L/mês.

## 1. Estudo da composição polifenólica dos vinhos

### 1.1. Índice de fenóis totais

Os resultados referentes ao índice de fenóis totais para os vinhos em estudos estão apresentados na figura 28:



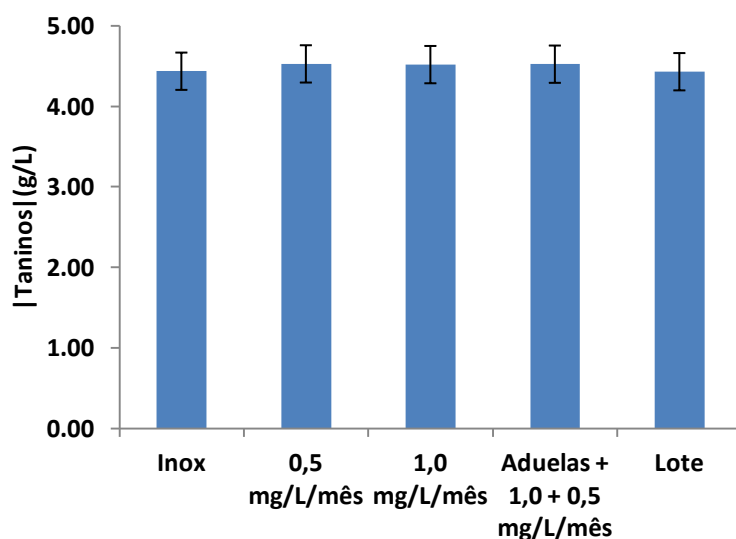
**Figura 28** - Índice de fenóis totais dos ensaios Inox (Testemunho), das amostras micro-oxigenadas com diferentes concentrações de oxigénio e Lote.

Verifica-se que a composição de fenóis totais dos ensaios Inox e dos ensaios micro-oxigenados e Lote são semelhantes, não diferindo estatisticamente entre si após análise estatística realizada através da variância a um fator (ANOVA), seguido pelo Teste de Tukey. Verifica-se que todos os vinhos analisados, que provêm do mesmo lote inicial, possuem um elevado índice de fenóis totais ( $> 80$ ), não havendo diferenças mesmo entre ensaios micro-oxigenados.

## 1.2. Taninos proantociânicos totais

O doseamento dos TPA baseia-se na reação da sua decomposição em meio ácido por ação do calor (reação Bate –Smith), medindo-se a absorvância das soluções resultantes a 520 nm.

Os resultados obtidos na determinação do teor de taninos proantociânicos totais dos vinhos analisados, estão indicados na figura 29.



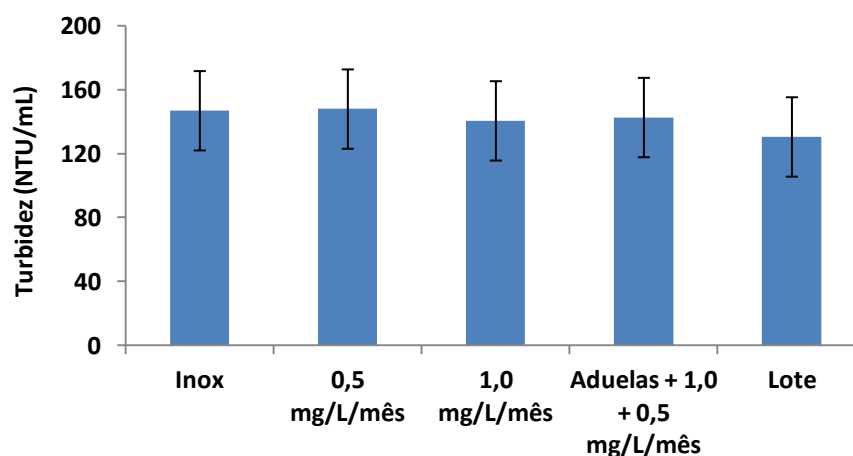
**Figura 29** - Taninos dos ensaios Inox (Testemunho), das amostras micro-oxigenadas com diferentes concentrações de oxigénio e Lote.

Analisando os resultados obtidos para os diferentes ensaios, não se verificam diferenças entre eles.

## 1.3. Poder tanante

Os taninos existentes no vinho possuem a capacidade de interagirem com as proteínas salivares formando complexos insolúveis, dando origem à sensação de adstringência. Nesta determinação é utilizado a proteína BSA.

O poder tanante dos ensaios em estudo, foi determinado por nefelometria e os resultados obtidos estão representados na figura seguinte:



**Figura 30** - Poder tanante dos ensaios Inox (Testemunho), das amostras micro-oxigenadas com diferentes concentrações de oxigénio e Lote.

Após a análise do poder tanante para os diferentes ensaios, verifica-se uma tendência entre os ensaios. Os ensaios Inox (sem qualquer incorporação de oxigénio) e o ensaio MO 0,5 mg/L/mês apresentam um valor ligeiramente mais elevado, dando a indicação que estas possuem maior capacidade de complexação com as proteínas, comparativamente com o ensaio MO 1,0 mg/L/mês e o ensaio Lote que possuem um valor mais baixo.

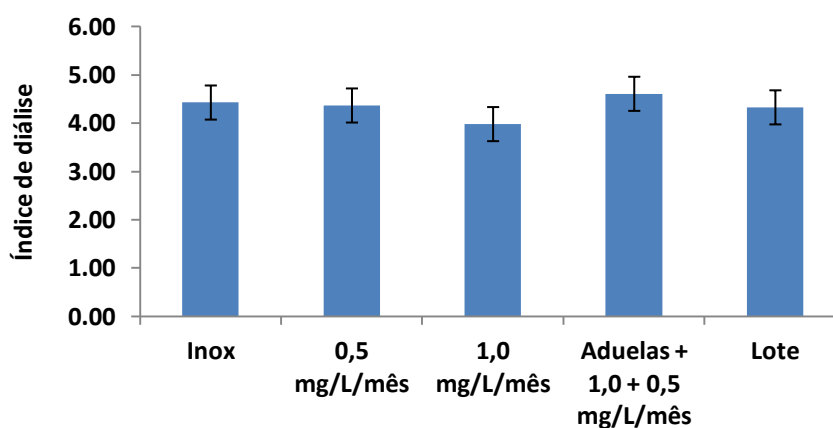
A amostra Aduelas + MO aproxima-se dos valores dos ensaios Inox e MO 0,5 mg/L/mês, o que é de esperar pois mesmo com MO, a adição de aduelas traduz-se numa sensação organolética adstringente, o que vai influenciar e aumentar o poder tanante da amostra.

Contudo, apesar de se verificar uma tendência entre os ensaios, estes não são estatisticamente diferentes.

#### 1.4. Índice de diálise

O índice de diálise permite avaliar a complexidade estrutural (tamanho) dos compostos fenólicos presentes num vinho. Os vinhos em estudo, são colocados no interior de membranas de diálise, permeáveis apenas a compostos de menores dimensões.

Os valores obtidos dos ensaios em estudo encontram-se na figura 31.



**Figura 31** - Índice de diálise entre o ensaio Inox (Testemunho), os ensaios micro-oxigenados e o ensaio Lote.

Da análise da figura anterior, verifica-se que o ensaio MO 1,0 mg/L/mês é o que apresenta menor índice de diálise, ou seja, existe menor complexidade estrutural neste ensaio. A MO do vinho com incorporação de aduelas induz à formação de compostos mais complexos, repercutindo-se num aumento do índice de diálise. Apesar de se verificar esta tendência, após a análise estatística da variância a um fator, verifica-se que as amostras são estatisticamente iguais.

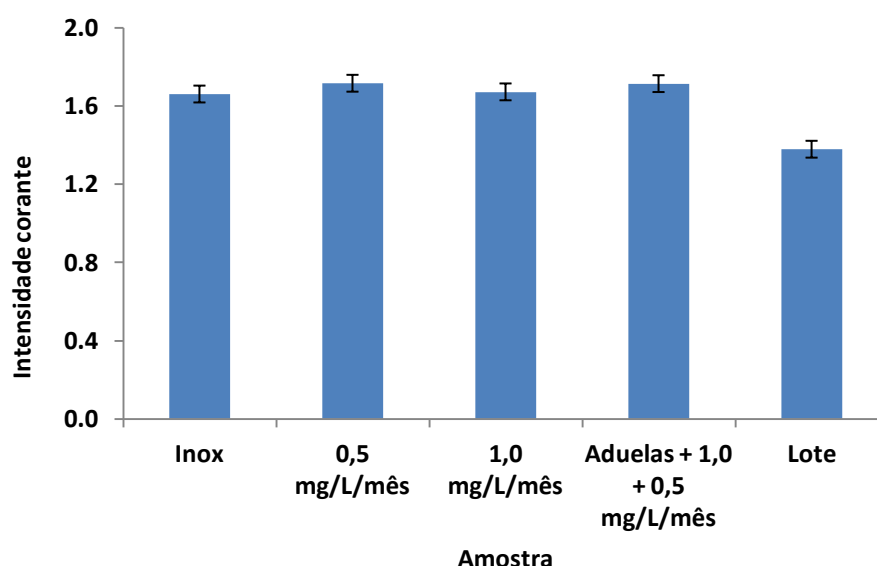


## 1.5. Análise da cor

### 1.5.1. Intensidade corante e índice de cor vermelha

A intensidade corante e o índice de cor vermelha, baseiam-se na medição direta de absorvância das diferentes amostras a 420 nm, 520 nm e 620 nm, e da absorvância a 520 nm respetivamente.

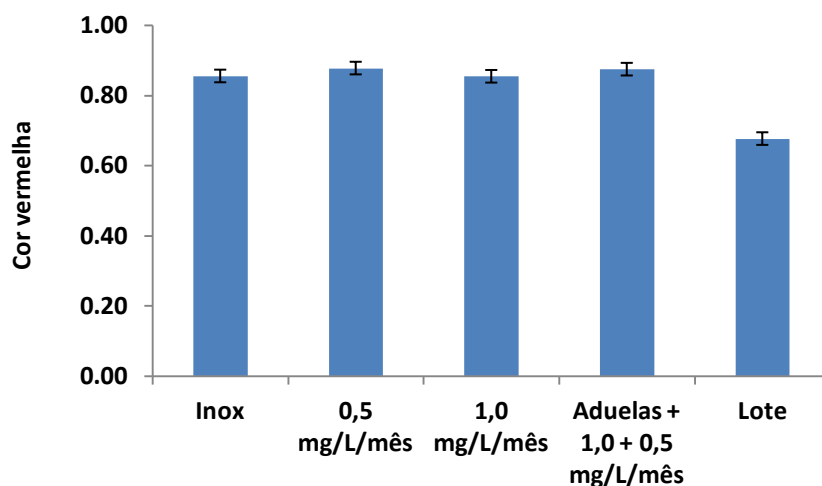
O comportamento dos ensaios estudados relativamente à intensidade corante está representado na figura 32.



**Figura 32** - Intensidade corante entre o ensaio Inox (Testemunho) e os ensaios micro-oxigenados.

Da análise à intensidade corante, verifica-se que todos os vinhos possuem uma intensidade corante elevada. Apenas o ensaio Lote se distingue estatisticamente dos restantes ensaios ( $p < 0,05$ ), com um valor inferior para este parâmetro.

O Índice de cor vermelha dos diferentes ensaios, encontram-se representados na figura 33.



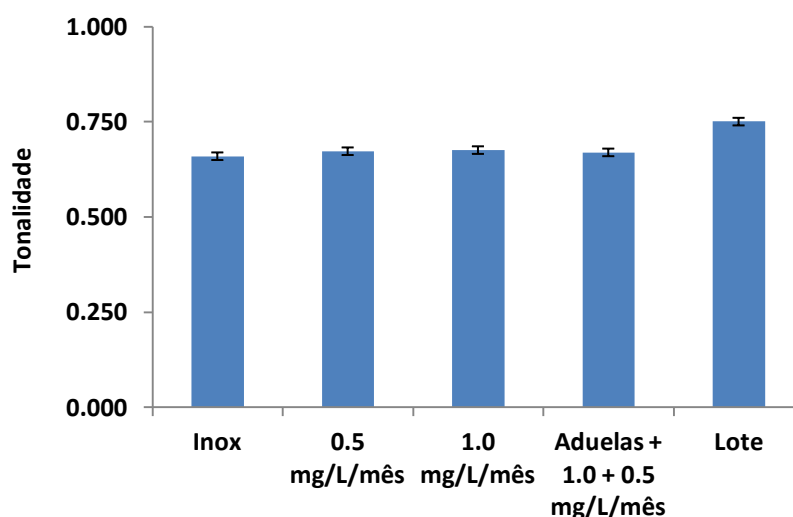
**Figura 33** - Índice de cor vermelha do ensaio Inox (Testemunho) e dos ensaios sujeitos a micro-oxigenação com diferentes concentrações de oxigénio e Lote.

Relativamente ao índice de cor vermelha, este dá-nos a indicação que os ensaios em estudo, exceptuando o ensaio Lote, possuem um elevado índice de cor vermelha.

Comparando os valores de índice de cor vermelha entre os diferentes ensaios, verifica-se que apenas o ensaio Lote é estatisticamente diferente, com um valor inferior de cor vermelha comparativamente com os restantes ensaios.

### 1.5.2. Tonalidade e % de cor

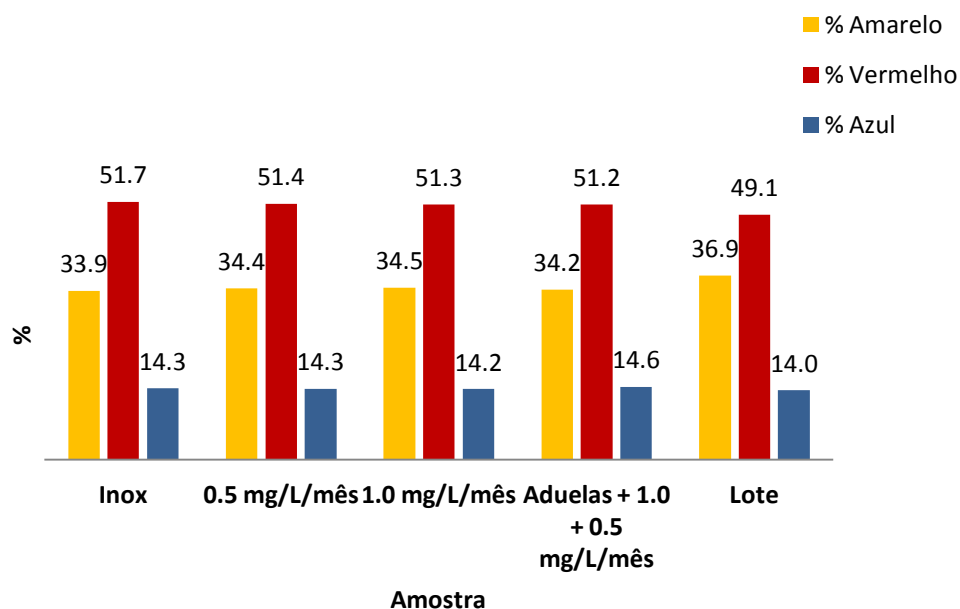
A tonalidade de um vinho permite inferir sobre a sua evolução e maturidade. Na figura 34 estão apresentados os resultados da tonalidade dos diferentes ensaios.



**Figura 34** - Tonalidade dos ensaios Inox (Testemunho), dos ensaios micro-oxigenados com diferentes concentrações de oxigénio e Lote.

Após análise dos resultados da tonalidade dos diferentes ensaios, verifica-se que a MO induz a um aumento da tonalidade comparativamente com o ensaio Inox. O ensaio Lote, revela-se com um valor elevado comparativamente com os outros ensaios, mostrando-se estatisticamente distinto dos restantes.

O conhecimento das diferentes percentagens de cor no vinho, dá-nos também a indicação da sua evolução. Na figura 35, estão representadas as diferentes percentagens para os ensaios em estudo.



**Figura 35** - Percentagem de cor dos diferentes ensaios.

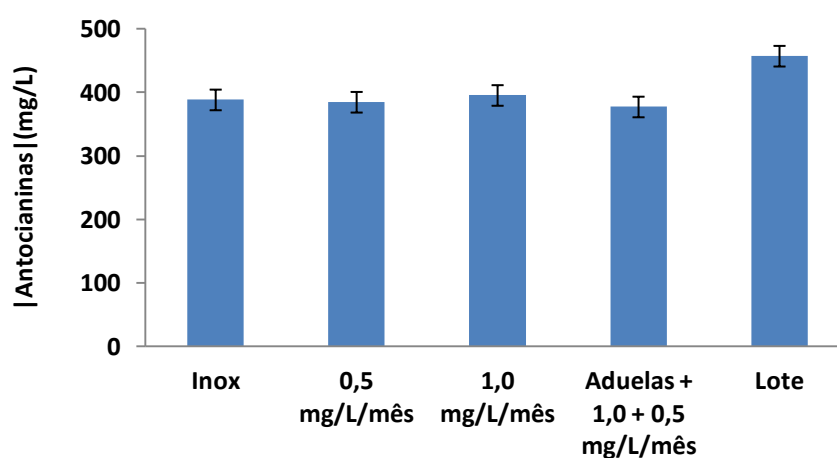
Analisando os resultados obtidos das diferentes percentagens de cor, verifica-se que apenas o Lote é diferente dos restantes ensaios, havendo uma maior percentagem de amarelo e uma menor percentagem de vermelho. Os restantes ensaios são semelhantes entre si.

Verifica-se que o comportamento da % de cor é concordante com o comportamento da intensidade corante, índice de cor vermelha e com a tonalidade dos diferentes ensaios analisados neste trabalho (figuras 32, 33 e 34).

## 1.6. Análise das antocianinas livres totais e antocianinas 3-monoglucósidas livres

### 1.6.1. Antocianinas livres totais

A figura 36 representa os resultados obtidos na determinação das antocianinas livres totais para as diferentes amostras em estudo.



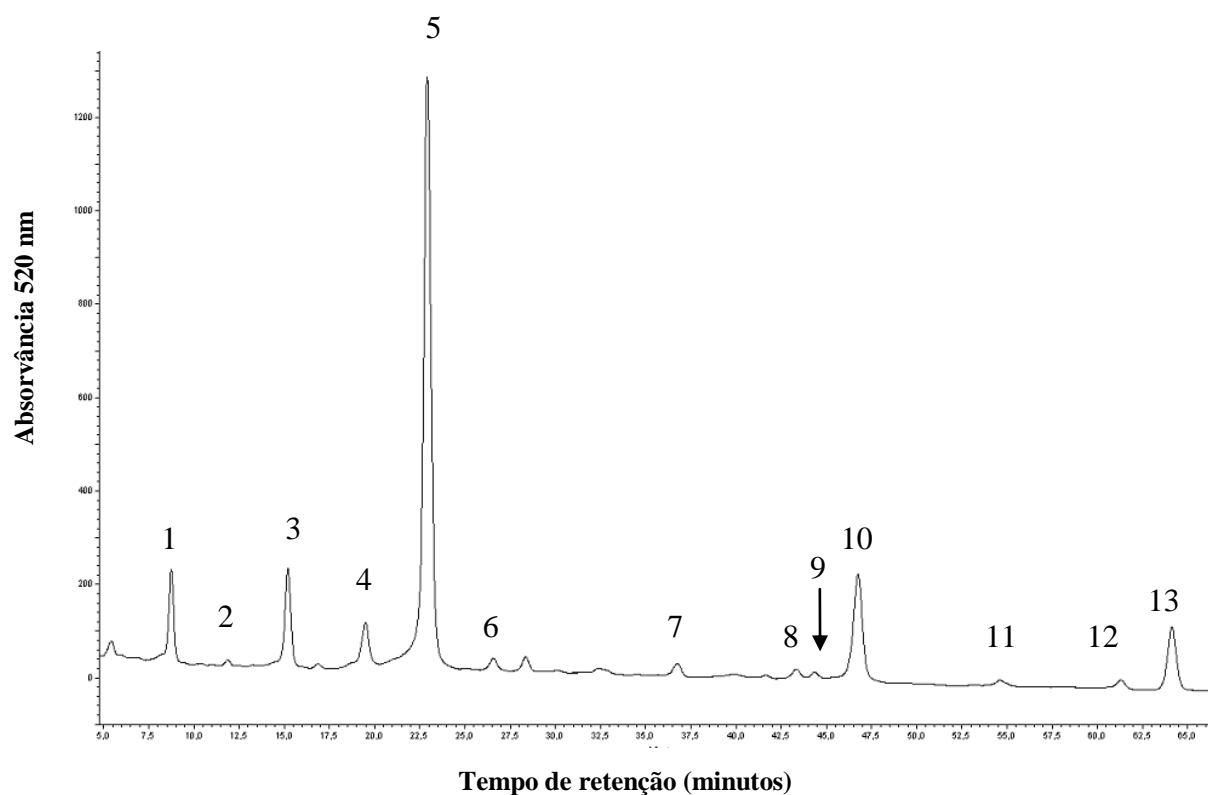
**Figura 36** - Comparação da concentração em antocianinas livres totais (mg/L) entre o ensaio Inox (Testemunha) e os ensaios micro-oxigenados.

Após a análise da concentração de antocianinas (mg/L) dos ensaios em estudo, verifica-se que o ensaio Lote destaca-se por possuir maior concentração que os restantes ensaios.

O ensaio Lote é estatisticamente diferente do ensaio Inox e dos ensaios MO 0,5 mg/L/mês, 1,0 mg/L/mês e aduelas com MO.

### 1.6.2. Antocianinas 3-monoglucósidas livres

Neste trabalho, realizou-se a pesquisa e quantificação das antocianinas 3-monoglucósidas livres dos diferentes ensaios por HPLC. A figura 37 representa o cromatograma obtido da análise das antocianinas 3-monoglucósidas livres do ensaio Inox (Testemunha) em estudo.

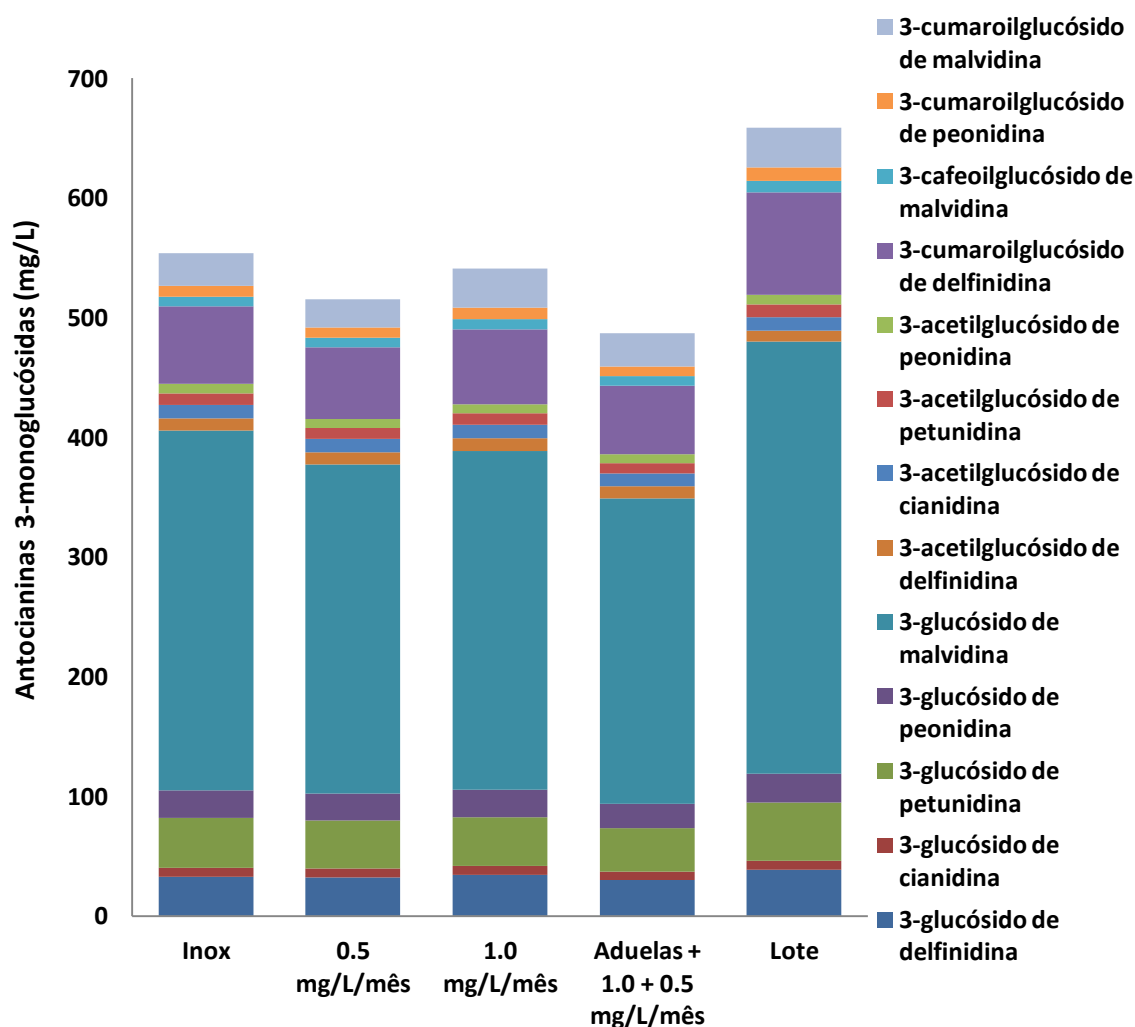


**Figura 37** - Cromatograma obtido por HPLC das antocianinas 3-monoglucósidas presentes no ensaio Testemunho.

**Legenda:**

- |   |  |
|---|--|
| <b>1:</b> 3-glucósido de delphinidina       | <b>8:</b> 3-acetilglucósido de petunidina      |
| <b>2:</b> 3-glucósido de cianidina          | <b>9:</b> 3-acetilglucósido de peonidina       |
| <b>3:</b> 3-glucósido de petunidina         | <b>10:</b> 3-cumaroilglucósido de delphinidina |
| <b>4:</b> 3-glucósido de peonidina          | <b>11:</b> 3-cafeoilglucósido de malvidina     |
| <b>5:</b> 3-glucósido de malvidina          | <b>12:</b> 3-cumaroilglucósido de peonidina    |
| <b>6:</b> 3-acetilglucósido de delphinidina | <b>13:</b> 3-cumaroilglucósido de malvidina    |
| <b>7:</b> 3-acetilglucósido de cianidina    |  |

A figura 38 representa a concentração relativa de antocianinas 3-monoglucósidas dos vinhos em análise.



**Figura 38** - Comparação da concentração relativa de antocianinas 3-monoglucósidas entre o ensaio Inox (Testemunho) e os ensaios micro-oxigenados e Lote.

Como era esperado, a malvidina 3-glucósido é a antocianina presente em maior quantidade.

Verifica-se que o comportamento das antocianinas 3-monoglucósidas é semelhante ao comportamento das antocianinas livres totais em todos os ensaios.

### 1.7. Teste de estabilidade oxidativa em vinhos tintos

No ensaio à estabilidade oxidativa dos vinhos em estudo, tendo em conta as alterações de cor e de aroma após 5 dias em estufa a 30°C (amostra sem adição de sulfuroso e amostra com adição sulfuroso), obtiveram-se os seguintes resultados:

Todos os vinhos em estudo são estáveis relativamente à cor - boa resistência à oxidação; mantendo as características cromáticas iniciais após 5 dias em estufa a 30°C, não se tendo observado diferenças visuais nos ensaios com sulfuroso e sem sulfuroso.

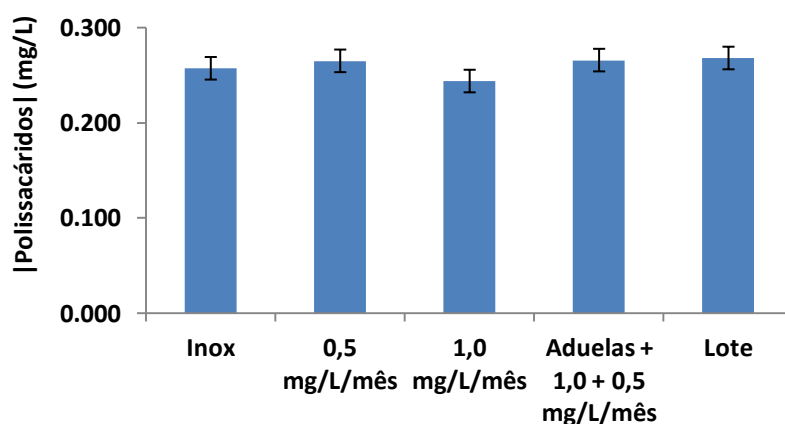
Relativamente ao aroma, verificou-se que as amostras Inox e Aduelas + MO apresentam aromas mais estáveis – aromas menos oxidados e menos intensos (descritores dos aromas encontrados palha, maçã alterada). As amostras micro-oxigenadas desenvolveram aromas oxidados bem mais acentuados (descritores dos aromas encontrados terra/cogumelo, batata, calda de azeitona, rato, alho, lático).

É de referir que a amostra Inox apresentou aromas mais frescos que os restantes ensaios (aromas descritores encontrados no ensaio Inox – menta, relva cortada).

### 1.8. Polissacáridos

Um dos fatores que influencia a interação entre proteínas e taninos, é a presença de polissacáridos em solução.

A concentração de polissacáridos dos ensaios em estudo estão representados na figura 39.



**Figura 39** - Comparação da concentração de polissacáridos entre o ensaio Inox (Testemunho) e os ensaios micro-oxigenados.

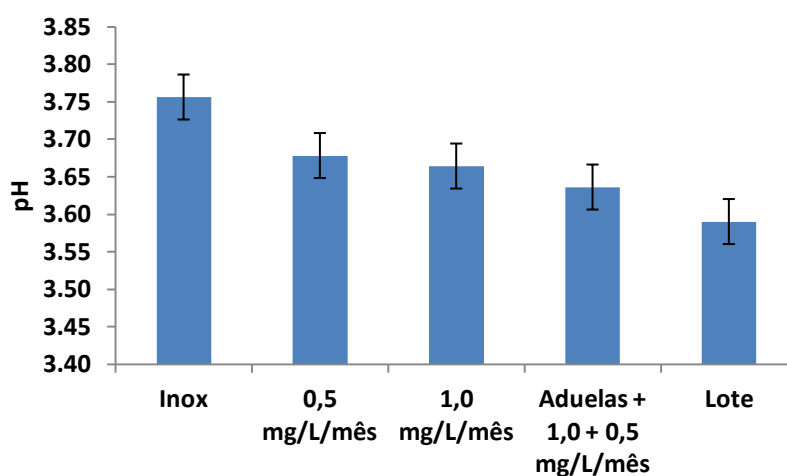


Da análise da concentração de polissacáridos (mg/L) dos ensaios em estudo, verifica-se que o ensaio com MO 1,0 mg/L/mês apresenta menor concentração comparativamente com os restantes ensaios.

No entanto, após análise estatística, considera-se que não existem diferenças significativas entre os diferentes ensaios.

### 1.9. pH

O valor do pH é sem dúvida um fator de variabilidade, fundamentalmente devido à sua influência direta no estado de equilíbrio da matéria corante presente no vinho (referido anteriormente), mas ao não se antever nenhum controlo a adotar, registou-se o valor de pH das amostras de vinho no momento da medição da sua cor.



**Figura 40** – pH dos ensaios Inox, com micro-oxigenação a diferentes concentrações e Lote.

Da análise dos resultados de pH dos diferentes ensaios, verifica-se que Inox possui um valor superior aos restantes ensaios, sendo o Lote o que possui o valor mais baixo. O valor de pH do ensaio Lote apresenta-se estatisticamente diferente dos valores de pH dos ensaios Inox e 0,5 mg/L/mês.

### 1.10. Análises enzimáticas

Na tabela 3 encontram-se os resultados obtidos das análises referentes à quantificação de D-Glucose+D-Fructose, Ácido L-Málico e Ácido Acético através de métodos enzimáticos.

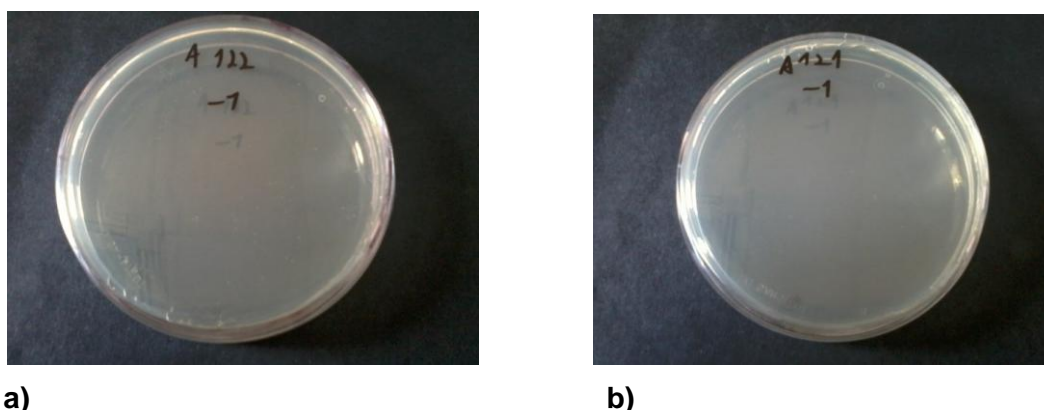
**Tabela 3** : Resultados obtidos na pesquisa de D-Glucose + D-Fructose ; Ácido L-Málico e ácido Acético por métodos enzimáticos.

Amostra	D-Glucose + D-Fructose (g/L)	Ácido L-Málico (g/L)	Ácido Acético (g/L)
INOX	< 2.0	< 0.05	0.25
0.5 mg/L/mês	< 2.0	< 0.05	0.26
1.0 mg/L/mês	< 2.0	< 0.05	0.27
Aduelas + MO	< 2.0	< 0.05	0.30
Lote	< 2.0	< 0.05	0.29

Pode-se verificar que o vinho loteado inicialmente é seco, a biodegradação do ácido málico foi completa e a concentração de ácido acético presente nas amostras tem valores abaixo de níveis preocupantes. Contudo, estes valores poderão estar um pouco alterados, no que respeita aos valores de ácido acético, dado que as amostras não foram descoloradas nem foi retirado o gás ao ensaio 1,0 mg/L/mês. Este procedimento deveria ter sido executado, dado que estes parâmetros interferem na análise.

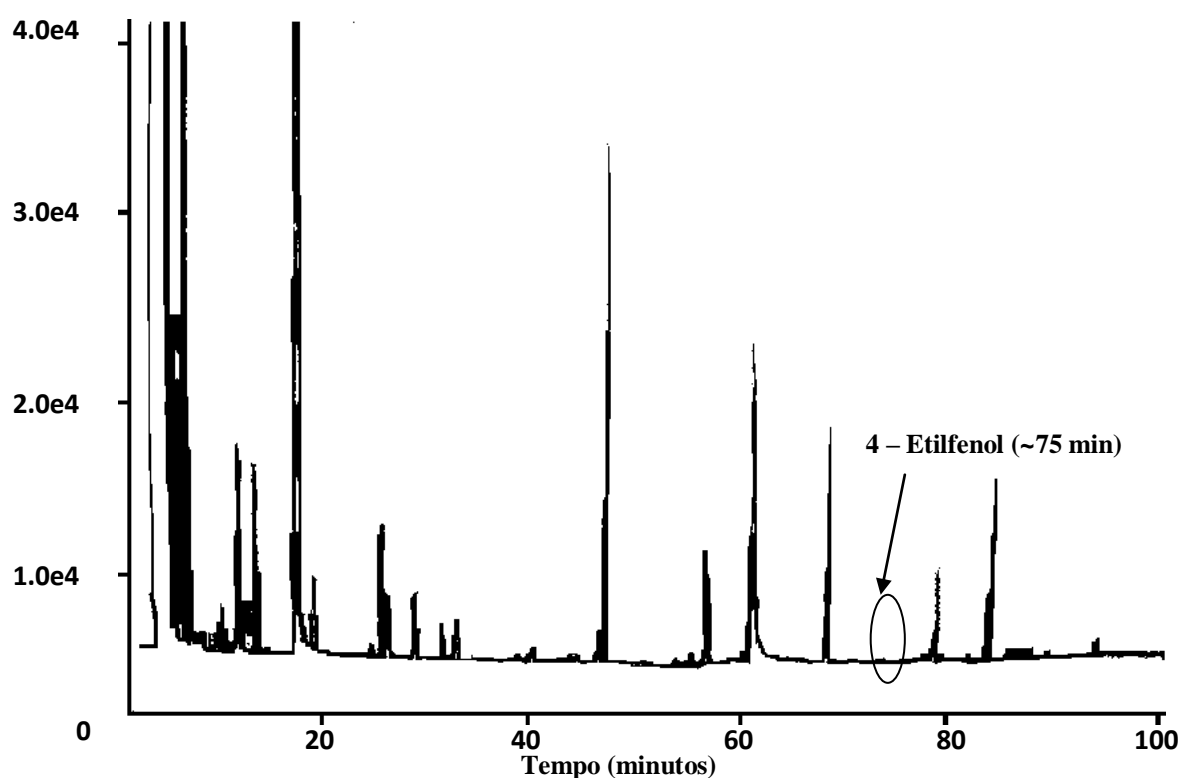
### 1.11. Pesquisa de *Dekkera/Brettanomyces*

Das inoculações efectuadas às amostras em estudo, verificou-se uma pequena contaminação na amostra 0.5 mg/L/mês, mas nada de significativo. Contudo, a amostra em estudo que apresentava gás - Inox 1.0 mg/L/mês, revelou-se limpa, sem crescimento.

**a)****b)**

**Figura 41** - Placas de Petri após 7 dias em estufa a 30°C: **a)** Amostra MO 0,5 mg/L/mês; **b)** Amostra MO 1,0 mg/L/mês.

A figura seguinte apresenta o cromatograma obtido à análise dos fenóis voláteis da amostra INOX em estudo por GC-FID.



**Figura 42** – Cromatograma da amostra INOX (Testemunho) dos compostos voláteis por GC-FID.

É de referir que os cromatogramas das amostras em estudo 0.5mg/L/mês e 1.0mg/L/mês apresentam picos com maiores áreas entre os tempos de retenção 40 – 70

minutos, comparativamente com o cromatograma da amostra INOX representado anteriormente.

**Tabela 4** : Tempos de retenção de alguns compostos voláteis, que poderão estar presentes nos vinhos.

<b>Compostos Voláteis</b>	<b>Tempo de Retenção (minutos)</b>	<b>Presença nas amostras em estudo</b>
<b>3 - Octanol</b>	29.56	<b>X</b>
<b>4 - Etilguaiacol</b>	67.42	<b>X</b>
<b>4 - Etilfenol</b>	74.69	<b>V</b>
<b>4 - Vinilfenol</b>	85.01	<b>X</b>

As concentrações de 4-Etilfenol das amostras em estudo encontram-se na tabela seguinte:

**Tabela 5** : Concentração de 4-etilfenol dos ensaios em estudo.

<b>Amostra</b>	<b> 4-Etilfenol  (mg/L)</b>
<b>INOX</b>	0.034
<b>0.5 mg/L/mês</b>	0.032
<b>1.0 mg/L/mês</b>	0.026
<b>Aduelas + 1.0 + 0.5 mg/L/mês</b>	0.027
<b>Lote</b>	0.026

Face aos resultados obtidos, as amostras em estudo encontram-se sem qualquer problema associado à presença de *Dekkera/ Brettanomyces*.

## 1.12. Análise sensorial

Da análise sensorial feita pelo painel de provadores, resultam as seguintes descrições:

-Amostra **INOX** : aroma fechado, um pouco reduzido, boca potente, concentrado. Final de boca marcado pelos taninos pouco refinados, deixando a boca árida.

-Amostra **0.5 mg/L/mês** : aroma um pouco mais aberto, expressivo, fruta madura (compota). Entrada de boca redondo, taninos consistentes. Final de boca com taninos presentes.

-Amostra **1.0 mg/L/mês** : aroma mais aberto, mais evoluído, ligeiro toque a amanteigado, entrada de boca mais redondo. Taninos mais redondos presentes no fim.

-Amostra **Aduelas + 1.0 mg/L/mês + 0.5 mg/L/mês** : aroma expressivo, bastante marcado pela madeira mas limpo que confere mais estrutura ao vinho. Boca encorpado mas elegante, suave ataque, final marcado pela madeira.

-Amostra **Lote**: aroma limpo, aberto, agradável. Boca redondo, suave, equilibrado, menos adstringente. Final elegante mas longo.

Contudo, é de referir que todos os vinhos se apresentaram equilibrados a nível da acidez e teor alcoólico.

## Tabela resumo resultados

Tabela 6: Resumo resultados obtidos relativamente às análises efetuadas.

Ensaio	INOX <sup>(a)</sup>	0.5 mg/L/mês <sup>(b)</sup>	1.0 mg/L/mês <sup>(c)</sup>	Aduelas + 1.0 + 0.5 mg/L/mês <sup>(d)</sup>	Lote <sup>(e)</sup>	ANOVA 1 fator	Teste Tukey
IFT	84,5±1,9	84,2±1,9	84,6±1,9	85,9±1,9	88,6±1,9	ns	-
Taninos (mg/L)	4,44±0,19	4,53±0,25	4,52±0,18	4,52±0,35	4,43±0,18	ns	-
Poder tanante (NTU/mL/vinho)	147±26	148±20	140±28	143±24	130±25	ns	-
Índice diálise	4,43±0,26	4,37±0,51	3,98±0,27	4,61±0,20	4,33±0,53	ns	-
IC	1,660±0,051	1,716±0,029	1,671±0,042	1,714±0,028	1,378±0,067	s	s <sup>(e)</sup>
ICV	0,855±0,018	0,878±0,010	0,854±0,018	0,875±0,015	0,677±0,030	s	s <sup>(e)</sup>
Tonalidade	0,660±0,001	0,673±0,001	0,676±0,001	0,670±0,001	0,751±0,001	s	s <sup>(e)</sup>
Antocianinas livres totais (mg/L)	388±15	385±19	395±16	377±15	457±17	s	s <sup>(e)</sup>
Antocianinas 3- monoglucósidas livres (mg/L)	554	515	541	487	659	-	-
Teste estabilidade oxidativa	Est.	Est./Inst	Est./Inst.	Est.	Est./Inst.	-	-
Polissacáridos (mg/L)	0,26±0,01	0,26±0,01	0,24±0,01	0,27±0,01	0,27±0,02	ns	-
pH	3,76±0,05	3,68±0,04	3,66±0,04	3,64±0,04	3,59±0,04	s	s <sup>(a)(e)</sup>

ns – diferenças não significativas; s – diferenças significativas; s<sup>(e)</sup> – diferenças significativas entre os ensaios (e) e os restantes ensaios; s<sup>(a)(e)</sup> – diferenças significativas entre os ensaios (a) e (e).

## Discussão dos resultados

Apesar da reconhecida influência do oxigênio na evolução da matéria corante e na formação de novos compostos poliméricos nos vinhos tintos, para as concentrações de oxigênio estudadas, a sua evolução nas diferentes amostras mostrou-se consideravelmente equivalente, tal como o sucedido em outros estudos (Ricardo Da Silva e Laureano 2004).

Contudo, o ensaio Lote, constituído por 50% inox (incluído o ensaio), 30% tonéis e cubas com aduelas e 20% em barricas, mostrou ser estatisticamente diferente na sua composição cromática e pH comparativamente com os restantes ensaios.

Após a análise dos resultados, embora pareça haver uma tendência nos ensaios, não existem alterações significativas a nível de concentração de taninos e alterações no grau de polimerização dos compostos fenólicos para todos os ensaios - Inox, 0,5 mg/L/mês, 1,0 mg/L/mês, Aduelas + MO e Lote, tal como os resultados obtidos por Llaudy et al. (2006); Pour-Nikfardjam e Dykes (2003) em que ensaios de MO mostraram aumentos marginais ou não significativos (Atanassova et al. 2002, Dykes e Kilmartin 2007) no grau de polimerização de flavonóides comparativamente com os vinhos Testemunha.

Em geral, vinhos micro-oxigenados possuem uma percentagem mais elevada de novos pigmentos derivados de antocianinas. A sua formação é favorecida em vinhos com conteúdos fenólicos totais mais elevados, como é o caso. Estes compostos, por sua vez, aumentam a intensidade corante do vinho. Através da análise dos resultados anteriores, é possível verificar que, a intensidade corante tende a ser ligeiramente superior no vinho micro-oxigenado, exceptuando o ensaio Lote, o que está de acordo com o descrito por alguns autores (Cano López et al. 2005, Iniesta et al. 2005, Pérez-Magariño et al. 2007). O aumento da intensidade corante nos vinhos micro-oxigenados em estudo pode dever-se, apesar da perda de antocianinas livres, ao maior nível de antocianinas poliméricas, pigmentos responsáveis pela estabilidade de cor dos vinhos ao longo do tempo.

A cor amarela, representada pela densidade ótica a 420 nm, aumentou ligeiramente nos diferentes ensaios com MO, verificando-se valor mais alto para o ensaio Lote. Essa evolução é característica normal dos vinhos tintos durante a sua evolução.

A densidade ótica a 620 nm indica a quantidade de polímeros de cor azul que estão presentes no vinho. Os polímeros de cor azul provêm da união entre as proantocianidinas e antocianinas através de ponte de etanal, que é a ligação entre o C8 da proantocianidina e do C4 da antocianina. A cor azul apresenta-se igual para todos os ensaios em estudo (figura 35, página 80).

O teste à estabilidade oxidativa de vinhos tintos revelou que os vinhos em estudo são estáveis relativamente à cor (boa resistência à oxidação) mantendo as características cromáticas iniciais, não se tendo observado diferenças visuais nos ensaios com sulfuroso e

sem sulfuroso. Este teste vem confirmar as pequenas variações encontradas nos diferentes ensaios para a intensidade corante, índice de cor vermelha e concentrações de antocianinas livres totais dos ensaios Inox (Testemunho), MO 0,5mg/L/mês, MO 1,0 mg/L/mês e Aduelas + 1,0 mg/L/mês + 0,5 mg/L/mês.

De um modo geral, a habilidade de consumir oxigénio está diretamente relacionada com as suas concentrações relativas de polifenóis, uma vez que os compostos fenólicos são os maiores consumidores de oxigénio (60%), conjuntamente com etanol (20%) e dióxido de enxofre (12%) (Devatine et al. 2007). Os vinhos em estudo possuem elevado índice de fenóis totais, o que lhes permite ter uma elevada resistência à oxidação, daí resultarem poucas diferenças relativamente aos parâmetros em estudo. Há ainda a salientar que o vinho sofreu apenas uma trasfega após MLF, ou seja, o vinho não se encontrava totalmente límpido aquando o início da MO, podendo este facto interferir no resultado final do processo de MO.

A presença de gás na amostra sujeita a maior concentração de oxigénio – 1,0 mg/L/mês, indica que o uso desta técnica terá de ser executada com as maiores precauções e deverá ter-se em conta a concentração de SO<sub>2</sub> no momento de incorporação do oxigénio. Não foi realizada análise ao SO<sub>2</sub> nos ensaios em estudo (em garrafa), contudo há a informação de que foi adicionado SO<sub>2</sub> após final da MLF (para níveis de cerca 30-35 mg/L SO<sub>2</sub> livre), havendo a preocupação de manter esta concentração ao longo dos seis meses de MO, com o intuito de proteger o vinho de microorganismos e de oxidações excessivas. Tendo em consideração que para o valor médio de pH do vinho em estudo (pH = 3,67 sem contabilizar valor de pH do ensaio Lote), assumindo que o valor se manteve a 35 mg/L de SO<sub>2</sub> livre ao longo dos seis meses de MO, verifica-se que está presente <0,50 mg/L SO<sub>2</sub> molecular livre, sendo esta concentração (0,50 mg/L SO<sub>2</sub>) suficiente apenas para inibição de bactérias encontrando-se longe do valor 1,0 mg/L referido em bibliografia como dose de completa inibição de microorganismos ([http://www.hannacom.pt/pdf/hi\\_84100.pdf](http://www.hannacom.pt/pdf/hi_84100.pdf)).

Não deverá ser esquecido, que deverá haver mais cuidado usando MO após MLF, uma vez que um excesso de acetaldeído poderá acumular-se no vinho. A LAB, consome acetaldeído durante a MLF (Osborne et al. 2000), desta forma, qualquer excesso de acetaldeído produzido antes da MLF em presença de MO, irá ser eliminado pela bactéria, originando um vinho de melhor qualidade organolética. Este efeito não ocorre obviamente após MLF com MO.

Considera-se que para o tipo de vinho em análise – Lote com dois anos de idade e sujeito a MO, os valores de ácido acético determinados poderão não corresponder à realidade. A sua quantificação foi determinada enzimaticamente, no entanto não se teve o cuidado de remoção do gás e da cor das amostras para a execução da análise (estes



fatores interferem na determinação). Os valores encontram-se muito abaixo de valores considerados preocupantes ( $< 0,6$  g/L de ácido acético), no entanto não é de descartar a hipótese de estar a ocorrer a oxidação do etanol com a formação do etanal e libertação de  $\text{CO}_2$ , mesmo com os valores de ácido acético inferiores a  $0,6$  g/L. Há também a considerar que a oxigenação promove o crescimento de microorganismos aeróbicos. A bactéria ácido-acética (AAB), a bactéria ácido-lática (LAB) e *Dekkera/Brettanomyces* são os organismos aeróbicos mais importantes no processo de vinificação (du Toit et al 2006; Paul, 2002).

Dado que não se verificou a presença de *Dekkera/Brettanomyces* nos ensaios, descarta-se a hipótese que a presença de gás provém do metabolismo destas leveduras. Há então a considerar a formação de diacetil, que poderá ocorrer pela degradação do ácido cítrico pelo mecanismo decrito na figura 27 (página 50), sem no entanto ocorrer a formação de ácido acético. Será portanto a LAB que está a degradar o ácido cítrico, após degradação total do ácido málico, originando a libertação de  $\text{CO}_2$  e atribuindo ao vinho alguns aromas característicos deste fenómeno – ligeiro amanteigado.

Uma vez que o objetivo principal da empresa para a MO em tanques inox, é apenas a redução de aromas reduzidos e herbáceos, assim como proporcionar elegância – taninos mais polidos, amplitude em boca, aroma expressivo (início da fase de harmonização figura 24, página 42) – a concentração de  $0,5$  mg/L/mês é adequada para as alterações pretendidas para o tipo de vinho em questão. Esta constatação baseia-se nos resultados obtidos sem alterações a nível de concentração de taninos, antocianinas, pH, polissacáridos, índice de fenóis totais, comparativamente com o ensaio Inox (Testemunho), verificando-se sim alterações a nível sensorial já descritos anteriormente. Estes resultados vão de encontro com as recomendações do fornecedor do micro-oxigenador *Parsec*, que recomendam a concentração de  $0,2$  a  $1,2$  mg/L/mês para conservar os vinhos em cubas herméticas, evitando fenómenos de redução. Se se utilizassem concentrações superiores de oxigénio, seriam de esperar diferenças significativas entre os ensaios em estudo, nomeadamente reproduzir em cuba as condições de oxigenação em barricas.

A incorporação de aduelas, revelou um efeito curioso, na medida em que se verifica sensorialmente um toque de madeira bem acentuado, mas limpo, sem que houvessem alterações significativas a nível da composição polifenólica, polissacáridos e pH comparativamente com o ensaio Inox (Testemunha). O oxigénio incorporado pela madeira, parece não ter provocado evolução a nível físico-químico do ensaio, mas sim a nível sensorial.

## Conclusão

A MO foi desenvolvida com o intuito de harmonizar e conferir balanço aos vinhos tintos, numa tentativa de aproximação ao que ocorre no envelhecimento em barrica, minimizando desta forma os custos associados ao estágio/envelhecimento.

Se a Empresa pretender essa aproximação, deverá optar por concentrações mais elevadas de oxigénio, também sugeridas pela empresa fornecedora do *Parsec*, com o uso de aduelas, visto que a nível sensorial o ensaio com aduelas resultou bem.

No entanto, como a empresa não pretende colocar todo o volume produzido em madeira, a técnica de MO com a concentração 0,5 mg/L/mês durante seis meses, mostrou-se adequada para os objetivos inicialmente pretendidos – remoção de odores reduzidos, mais abertura do bouquet e ligeiro afinamento de taninos a nível sensorial.

Há que ter em consideração alguns parâmetros cruciais para que a MO ocorra com sucesso:

- definir inicialmente qual o efeito pretendido no vinho (figura 24, página 42);
- ter em conta as características iniciais do vinho (IFT) para a escolha da concentração usada de oxigénio e duração do estágio para obtenção do efeito pretendido;
- a temperatura do vinho, que deverá estar compreendida entre 15 -16 °C;
- se se optar pelo uso do sistema micro-difusor, ter em consideração a altura do tanque que deverá ter no mínimo 2,5 m;
- o difusor não deverá estar em contacto com as borras no fundo da cuba (máxima profundidade torneira a limpo);
- ter em atenção o volume da cuba. Um difusor poderá não ser eficiente na introdução de oxigénio no vinho – dispersão lateral. Em cubas de grande volume, o vinho exposto ao oxigénio poderá representar apenas uma pequena proporção do volume total de vinho. A sua incorporação é limitada e está dependente do movimento ascendente da bolha (velocidade de ascensão e tamanho), temperatura e volume da cuba.
- a concentração do SO<sub>2</sub> não muito elevada para não limitar o efeito do oxigénio incorporado, nem muito baixo para que não ocorram problemas microbiológicos e oxidações indesejáveis (valor recomendado de 100 mg/L SO<sub>2</sub> total).
- analisar com frequência alguns parâmetros físico-químicos do vinho, nomeadamente o SO<sub>2</sub>, acidez volátil complementando com a análise sensorial, dado que problemas microbiológicos poderão advir do uso da MO.

Se o ensaio Lote é o objetivo final pretendido para venda, sugiro uma mistura dos ensaios 0,5 mg/L/mês com o ensaio aduelas + MO.

## Perspetivas futuras

Sugiro a experimentação das novas tendências – tubagem em polidimetilsiloxano dentro da cuba de estágio; cubas de polietileno permeáveis ao oxigénio ou a micro-oxigenação electroquímica (ELMOX).

Seria interessante, num estudo posterior, verificar como ocorre o envelhecimento destes ensaios em garrafa, verificando se o declínio das antocianinas segue uma reação cinética de primeira ordem definida pela equação  $\ln |A| = -kt + \ln |A|_0$ , onde  $|A|$  corresponde à concentração de antocianinas (mg/L) e  $t$  é o período (meses) de envelhecimento em garrafa, estudado por diversos autores (Bakker 1986, Dallas et al. 1995, Mateus e De Freitas 2001a).

## Bibliografia

Adachi, O., Miyagawa, E., Shinagawa, K., Matsushita, K., Ameyama, M. **(1978)**. *Purification and properties of particulate alcohol dehydrogenase from Acetobacter aceti*. Agricultural and Biological Chemistry. 42, 2331-2340.

Adachi, O., Tayama, K., Shinagawa, K., Matsushita, K., Ameyama, M. **(1980)**. *Purification and characterization of membrane-bound aldehyde dehydrogenase from Gluconobacter suboxydans*. Agricultural and Biological Chemistry. 44, 503-515.

Adachi, O., Tayama, K., Shinagawa, K., Matsushita, K., Ameyama, M. **(1987)**. *Purification and characterization of particulate alcohol dehydrogenase from Gluconobacter suboxydans*. Agricultural and Biological Chemistry. 42, 2045-2056.

Alberto, M. R., Farias, M. E., & Manca de Nadra, M. C. **(2001)**. *Effect of gallic acid and catechin on Lactobacillus hilgardii 5w growth and metabolism of organic compounds*. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 49, 4359-4363.

Allen, M. **(1994)**. Advanced Oenology. Charles Sturt University.

Allen, M. **(1998)**. *Phenolics Demystified*. Proceedings of the Australian Society of Viticulture and Oenology Seminar – Phenolics and Extraction. Adelaide, Winetitles, Adelaide. 4-11.

Amerine, MA, Thoukis, G. **(1958)**. Vitis 1, 224.

Ameyama, M., Osada, E., Shinagawa, K., Matsushita, K., Adachi, O. **(1981)**. *Purification and characterization of aldehyde dehydrogenase of Acetobacter aceti*. Agricultural and Biological Chemistry. 45, 1889-1890.

Arfelli, G., Sartini, E., Corzani, C., Fabiani, A. **(2011)**. *Chips, lees, and micro-oxigenation: Influence on some flavors and sensory profile of a bottled red Sangiovese wine*. European Food Research and Technology. 233 (1), 1-10.

Arnold, R. A., Noble, A. C., Singleton, V. L. **(1980)**. *Bitterness and astringency of phenolic fractions in wine*. Journal of Agricultural Food Chemistry. 28, 675-678.

Arts, I. C. W., Van De Putte, B., Hollman, P. C. H. **(2000b)**. *Catechin contents of food commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods.* Journal Agricultural Food Chemistry. 48, 1752-1757.

Arts, I. C. W., Van De Putte, B., Hollman, P. C. H. **(2000a)**. *Catechin contents of food commonly consumed in the Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk.* Journal Agricultural Food Chemistry. 48, 1746-1751.

Arvik, T., Conterno, L., Henick-Kling, T. **(2002a)**. *Brettanomyces bruxellensis in New York State wines: A global issue.* In Proceedings from the 31st Annual New York Wine Industry Workshop. Geneva, New York.

Arvik, T., Henick-Kling, T. **(2002)**. *Brettanomyces bruxellensis occurrence, growth, and effect on wine flavor.* In Proceedings from the 31st Annual New York Wine Industry Workshop. Geneva, New York.

Asenstorfer RE, Iland PG, Tate ME, Jones GP. **(2003)**. *Charge equilibria and pK(a) of malvidin-3-glucoside by electrophoresis.* Analytical Biochemistry. 318(2):291e9.

Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheynier, V., Moutounet, M. **(2002)**. *Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making.* Analytica Chimica Acta. 458, 15-27.

Ayestarán, B., Guadalupe, Z., León, D. **(2004)**. *Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process.* Analytica Chimica Acta.

Bakker, J.; Timberlake, C. F. **(1997)**. *Isolation, identification and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines.* Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45: 35-43.

Bakker, J. **(1986)**. *HPLC anthocyanins in port wines: determination of aging rates.* Vitis. 25, 203-214.

Baptista Ortín, A. B., Iniesta Ortiz, J. A., Pardo Mínguez, F., López Roca, J. M., Gómez Plaza, E. **(2008)**. *Estabilización del color de los vinos tintos utilizando la micro-oxigenación conjuntamente con taninos enológicos o virutas de roble. Una alternativa a la crianza en barricas*. Enólogos. 52, 38-41.

Bartowsky, E. J., Costello, P. J., D., Henschke, P. A. **(2002a)**. *Management of malolactic fermentation – wine flavor manipulation*. Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker. 461a, 7-12.

Bartowsky, E. J., Francis, I. L., Bellon, J. R., Henschke, P. A. **(2002b)**. *Is buttery aroma perception in wines predictable from diacetyl concentration?* Australian Journal of Grape Wine Research. 8, 180-185.

Bartowsky, E. J., Xia, D., Gibson, R. L., Fleet, R. L., Henschke, P. A. **(2003)**. *Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria*. Letters in Applied Microbiology. 36, 307-314.

Bartowsky, E. J., Henschke, P. A. **(2004)**. *The “buttery” attribute of wine – diacetyl-desirability, spoilage and beyond*. 96, 235-252.

Bartowsky, E. J., Henschke, P. A. **(2008)**. *Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine – A review*. International Journal of Food Microbiology. 125, 60-70.

Bate-Smith, E. C. **(1954)**. Food Chemistry. 23, 124.

Bate-Smith, E. C. **(1973)**. *Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency*. Phytochemistry. 12, 907-912.

Bermeyer, H. U., *Methods of Enzymatic Analysis*, 2<sup>nd</sup> Edition Volume 1, Academic Press, Inc. New York. 112-117.

Bertrand, A. **(1981)**. *Formation des substances volatiles au cours de la fermentation alcoolique. Incidence sur la qualité des vins*. Colloq Soc Fr Microbiol, Reims 251–267.

Bertrand, A., Smirou-Bonnamour, C., Lonvaud-Funel, A. **(1984)**. *Aroma compounds formed by malolactic bacteria*. In: Nykanen, L., Lehtonen, P. (Eds), Proceedings of the Alko

Symposium on Flavour Research of Alcoholic Beverages. Helsinki, 1984. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research. 39-49.

Blaauw, D. **(2009)**. *Micro-oxygenation in contemporary winemaking*. Thesis, Cape Wine Academy. Stellenbosch, South Africa.

Boselli, E., Boulton, R. B., Thorngate, J. H., Frega, N. G. **(2004)**. *Chemical and sensory characterization of DOC red wines from Marzhe (Italy) related to vintage and grape cultivars*. Journal of Agricultural Food Chemistry. 52, 3843-3854.

Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E. **(1996)**. *Principles and practices of winemaking*. Aspen. New York: Chapman & Hall.

Boulton, R. **(2001)**. *The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review*. American Journal of Enology and Viticulture. 52(2), 67–87.

Bourzeix, M.; Weyland, D.; Heredia, N. **(1986)**. *Étude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne*. Bulletin de l'O.I.V. 669-670, 1175-1254.

Brillouet, J., Bosso, C., Moutounet, M. **(1990)**. *Isolation, purification, and characterization of an arabinogalactan from a red wine*. American Journal of Enology and Viticulture. 41, 29- 36.

Brouillard R. **(1982)**. *Chemical structure of anthocyanins*. In: Markakis P, editor. *Anthocyanins as food colors*. Academic Press Inc. New York. 1-38

Brouillard R, Lang J. **(1990)**. *The hemiacetal-cis-chalcone equilibrium of malvin, a natural anthocyanin*. Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie. 68(5):755-61..

Campos, F. M., Couto, J. A., Hogg, T. A. **(2003)**. *Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii**. Journal of Applied Microbiology. 94, 167–174.

Cano-López, M., Pardo-Minguez, F., López-Roca, J. M., Gómez-Plaza, E. **(2006a)**. *Effect of micro-oxygenation of anthocyanin and derived pigment content and chromatic characteristics of red wines*. American Journal of Enology and Viticulture. 57, 325-331.

Cano-López, M., Pardo-Minguez, F., López-Roca, J. M., Gómez-Plaza, E. **(2006b)**. *Efecto de la micro-oxigenación sobre vinos de diferente contenido polifenólico*. Tecnología del Vino. 32, 45-50.

Cano-López, M., Pardo-Minguez, F., López-Roca, J. M., Gómez-Plaza, E. **(2007)**. *Chromatic characteristics and anthocyanin profile of a micro-oxygenated red wine after oak or bottle maturation*. European Food Research and Technology. 225, 125-132.

Cano-López, M., Pardo-Minguez, F., Schmauch, G., Saucier, C., Teissedre, P. L., López-Roca, J. M. **(2008)**. *Effect of micro-oxygenation on color and anthocyanin-related compounds of wines with different phenolic contents*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56, 5932-5941.

Cano-López, M., López-Roca, J. M., Pardo-Minguez, F., Gómez-Plaza, E. **(2010)**. *Oak barrel maturation vs. micro-oxygenation: Effect on the formation of anthocyanin-derived pigments and wine colour*. Food Chemistry. 119, 191–195.

Carbonneau, A. **(1991)**. *Conduite du vignoble et qualité du vin: des faux débats sur la densité de plantation à la "lyriculture"*. Rivista di Viticoltura e di Enologia 4, 329-333.

Carlton, W. K., Gump, B., Fugelsang, K., Hasson, A. S. **(2007)**. *Monitoring acetaldehyde concentrations during micro-oxygenation of red wine by headspace solid-phase microextraction with on-fiber derivatization*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55, 5620-5625.

Carvalho, E., Mateus, N., Plet, B., Pianet, I., Dufourc, E., De Freitas, V. **(2006)**. *Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54(23), 8936–8944.

Castellari, M., Matricardi, L., Arfelli, G., Amati, A. **(2000)**. *Level of single bioactive phenolics in red wine as a function of the oxygen supplied during storage*. Food Chemistry. 69, 61–67.



Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez, I. **(2007)**. *Flavonol profiles of Vitis vinifera red grapes and their single-cultivar wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55 (3), 992-1002.

Castillo-Muñoz, N., Winterhalter, P., Weber, F., Gómez, M. V., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E. **(2010)**. *Structure elucidation of peonidin 3,7-O- $\beta$ -diglucoside isolated from Garnacha Tintoreta (Vitis Vinifera L.)grapes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58 (20), 11105-11111.

Cavalcanti, R. N., Santos, D. T., Meireles, M. A. A. **(2011)**. *Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems — An overview*. Food Research International. 44, 499–509.

Cejudo-Bastante, M. J., Hermosín-Gutiérrez, I., Pérez-Coello, M. S. **(2011a)**. *Micro-oxygenation and oak chip treatments of red wines: Effects on colour-related phenolics, volatile composition and sensory characteristics. Part I: Petit Verdot wines*. Food Chemistry. 124, 727-737.

Cejudo-Bastante, M. J., Hermosín-Gutiérrez, I., Pérez-Coello, M. S. **(2011b)**. *Micro-oxygenation and oak chip treatments of red wines: Effects on colour-related phenolics, volatile composition and sensory characteristics. Part II: Merlot wines*. Food Chemistry. 124, 738-748.

Celotti, E., Zucchetto, M. **(2004)**. *Exemple de gestion raisonnée de la micro-oxygenation appliquée a un vin rouge*. Wine Internet Technical Journal. 14, 1–9.

Chatonnet, P., Pons, M. **(1990)**. *Elevage des vins rouges futs de chene: evoluton de certains composes volatiles et de lur impact aromatique*. Sciences des Aliments. 10, 565-587.

Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J., Pons, M. **(1992)**. *The origin of ethylphenols in wines*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 60, 165-178.

Chatonnet, P., Boidron, J.N., Dubourdieu, D. **(1993)**. *Influence des conditions d'élevage et de sulfitage des vins rouges en barriques sur leur teneur en acide acétique et en ethyl-phenols*. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin. 27, 277– 298.

Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J.N. **(1995)**. *The influence of Brettanomyces/Dekkera sp. and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines.* American Journal of Enology and Viticulture. 46 (4), 463– 467.

Chatonnet, P., Viala, C., Dubourdieu, D. **(1997)**. *Influence of polyphenolic compounds of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols.* American Journal of Enology and Viticulture. 48 (4), 443–448.

Cheyrier, V.; Rigaud, J.; Da Silva, J. R. **(1992)**. *Structure of procyanidin oligomers isolated from grape seeds in relation to some of their chemical properties.* In: Plant polyphenols. (Ed. R. W. Hemingway and P.E. Laks), Plenum Press, New York. 281-294.

Cheyrier, V., Atanasova, V., Fulcrand, H., Mazauric, J., Moutounet, M. **(2002)**. *Oxygen in wine and its role in phenolic reactions during ageing.* In Proceedings of the ASVO seminar uses of gases in winemaking. Adelaide. Australian Society of Viticulture and Oenologie. 23-27.

Cogan, T. M. **(1987)**. *Co-metabolism of citrate and glucose by Leuconostoc spp.: effects of growth, substrates and products.* Journal Applied of Bacteriology. 63, 551-558.

Coulter, A., Robinson, E., Cowey, G., Francis, I., Lattey, K., Capone, D. **(2003)**. *Dekkera/Brettanomyces yeast: An overview of recent AWRI investigations and some recommendations for its control.* In proceedings of the 2002 ASVO Seminar. 41-50. Tanunda, Australia.

Coombe, B.G., McCarthy, M. G. **(1987)**. *Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening.* Australian Journal of Grape and Wine Research. 6, 131–135.

Couto, J. A., Barbosa, A., Hogg, T. **(2005)**. *A simple cultural method for the presumptive detection of the yeasts Brettanomyces/Dekkera in wines.* Letters in Applied Microbiology. 41(6), 505-510.

Couto, J. A., Campos, F. M., Figueiredo, A. R., Hogg, T. **(2006)**. *Ability of lactic acid bacteria to produce volatile phenols.* American Journal for Enology and Viticulture. 57(2), 166-171.

Cruz, L., Teixeira, N., Silva, A. M. S., Mateus, N, Borges, J., De Freitas, V. **(2008)**. *Role of vinylcatechin in the formation of pyranomalvidin-3-glucoside-(+)-catechin*. Journal of Agricultural Food Chemistry. 56, 10980-10987.

Dallas, C., Ricardo da Silva, R. J. M., Laureano, O. **(1995)**. *Degradation of oligomeric procyanidins and anthocyanins in a Tinta Roriz red wine during maturation*. Vitis. 34, 51-56.

Danilewicz, J. **(2003)**. *Review of reaction mechanism of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper*. American Journal of Enology and Viticulture. 54, 73-85.

Danilewicz, J. **(2008)**. *Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: Central role of iron and copper*. American Journal of Enology and Viticulture. 58, 53–60.

Darné, G. **(1991)**. *Recherches sur la composition en anthocyanes des grappes et des feuilles de vigne*. PhD Thesis. University of Bordeaux I - France.

Davies, A., Mazza, G. **(1993)**. *Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds*. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 41, 716-720.

Decendit, A., Waffo-Teguo, P., Richard, T., Krisa, S., Vercauteren, J., Monti, J. - P. **(2002)**. *Galloylated catechins and stilbene diglucosides in Vitis vinífera cell suspension cultures*. Phytochemistry. 60(8), 795-798.

De Freitas, V. A. P. **(1995)**. *Recherches sur les Tanins Condensés: Application a l'Etude des Structures et Propriétés des Procyanidines du raisin et du vin*. PhD Thesis. Faculty of Enology. University of Bordeaux II (France).

De Freitas, V., Carvalho, E., Mateus, N. **(2003)**. *Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry*. Food Chemistry. 81, 503- 509.

De Freitas, V., Mateus, N. **(2006)**. *Chemical transformations of anthocyanins yielding a variety of colours (Review)*. Environmental Chemistry Letters. 4, 175-183.

Del Álamo, M., Nevares, I., Gallego, L., Fernández de Simón, B., Cadahía, E. **(2010)**. *Micro-oxygenation strategy depends on origin and size of oak chips or staves during accelerated red wine aging*. Analytica Chimica Acta. 660 (1-2), 92- 101.

De Man, J. C. **(1959)**. *The formation of diacetyl and acetoin from  $\alpha$ - acetolactic acid*. Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas. 78, 480-485.

De Mendonça, S., Nascimento, C. *Microbiologia Industrial – CEFET-PE*  
*Técnicas de Laboratório*.

De Revel, G., Bertrand, A. **(1994)**. *Dicarbonyl compounds and their reduction products in wine. Identification of wine aldehydes*. In: Maarse, H., van der Heij, D. G. (Eds.) Trends in Flavour Research. Elsevier Science, Amsterdam. 353-361.

Devatine, A., Chiciuc, I., Poupot, C., Mietton-Peuchot, M. **(2007)**. *Micro-oxygenation of wine in presence of dissolved carbon dioxide*. Chemical Engineering Science. 62, 4579-4588.

Dicks, L. M. T., Dellaglio, F., Collins, M. D. **(1995)**. *Proposal to reclassify Leuconostoc oenos as Oenococcus oeni (corrig.) gen. nov. comb. Nov.* International Journal of Systematic Bacteriology. 45, 395-397.

Doco, T., Brillouet, J. **(1993)**. *Isolation and characterization of a rhamnogalacturonan II from red wine*. Carbohydrate Research. 243, 333-343.

Doco, T; Williams, P; Moutounet, M; Pellerin, P. **(2000)**. *Les polysaccharides du vin* bulletin de l'O.I.V. 73 (837-838): 785-792.

Dougall DK, Baker D. C. **(2008)**. *Effects of reaction mixture and other components on the determination of the equilibrium and rate constants of the hydration reactions of anthocyanins*. Food Chemistry. 107(1), 473-82.

Drysdale, G. S., Fleet, G. H. **(1988)**. *Acetic acid bacteria in winemaking: a review*. American Journal of Enology and Viticulture. 39, 143-154.

Dubois, P. **(1994)**. *Les arômes des vins et leurs défauts*. Revue Française d'Oenologie. N° 146 (1994), 39-49.

du Toit, M., Pretorius, I. S. **(2000)**. *Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal – a review*. South African Journal of Enology and Viticulture. 21, 76-96.

du Toit, W. J., Marais, J., Pretorius, I. S., Du Toit, M. **(2006)**. *Oxygen in must and wine: A review*. South Africa Journal of Enology and Viticulture. 27, 76-94.

du Toit, W., Lisjak, K., Marais, J., du Toit, M. **(2006)**. *The effect of microoxygenation on the phenolic composition, quality and aerobic wine-spoilage microorganisms of different South African red wines*. South African Journal for Enology and Viticulture. 27, 57–67.

du Toit, W. J. **(2007a)**. *Micro-oxygenation in South African wine: Part I*. <<http://www.wynboer.co.za/recentarticles/200706micro.php3>>.

du Toit, W. J. **(2007b)**. *Micro-oxygenation in South African wine: Part II*. <<http://www.wynboer.co.za/recentarticles/200707micro.php3>>.

Dykes, S. **(2007)**. *The effect of oxygen dosage rate on the chemical and sensory changes occurring during micro-oxygenation of New Zealand red wine*. Ph.D. Thesis, The University of Auckland, New Zealand.

Dykes, S., Kilmartin, P. **(2007)**. *Micro-oxygenation: Optimising the maturation process*. Australian wine Industry Journal. 22, 31-41.

EC **(2006)**. Commission Regulation (EC) No 1507/2006 of 11 October 2006 amending Regulations (EC) No 1622/2000, (EC) No 884/2001 and (EC) No 753/ 2002 concerning certain detailed rules implementing Regulation (EC) No 1493/1999 on the common organization of the market in wine, as regards the use of pieces of oak wood in winemaking and the designation and presentation of wine so treated. Official Journal of the European Union. L280, 2006, 9-11.

Edlin, D., Narbad, A., Dickinson, J.R., Lloyd, D. **(1995)**. *The biotransformation of simple phenolic compounds by Brettanomyces anomalus*. FEMS Microbiology Letters. 125, 311–316.

Eglinton, J., Henschke, P. **(1999b)**. *Restarting incomplete fermentations: the effect of high concentrations of acetic acid*. Australian Journal of Grape and Wine Research. 5, 71–78.

Escalona, H., Birkmyre, L., Piggott, J. R., Paterson, A. **(2002)**. *Effect of maturation in small oak casks on the volatility of red wine aroma compounds*. Analytica Chimica Acta. 458, 45-54.

Escot, S., Feuillat, M., Dulau, L., Charpetier, C. **(2001)**. *Release of polysaccharides by yeasts and the influence of release polysaccharides on color stability and wine astringency*. Australian Journal of Grape and Wine Research. 7(3), 153–159.

Escribano-Bailón, M. T., Guerra, M. T., Rivas-Gonzalo, J. C., Santos-Buelga, C. **(1995)**. *Proanthocyanidins in skins from different grape varieties*. Z. Lebensm. – Unters. – Forsch. 200, 221-224.

Escribano-Bailón, M. T., Dangles, O., Brouillard, R. **(1996)**. Phytochemistry. 41, 1583.

Escribano-Bailón, M. T., Alvarez-Garcia, M., Rivas-Gonzalo, J. C., Heredia, F. J., Santos-Buelga, C. **(2001)**. Journal Agriculture Food Chemistry. 49, 1213.

Es-Safi, N.-E.; Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Moutounet, M. **(1999)**. *Studies on the acetaldehyde-induced condensation of (-)-epicatechin and malvidin 3-O-glucoside in a model solution system*. Journal of Agriculture Food Chemistry. 47, 2096-2102.

Etievant, P., Schlich, P., Bouvier, J. C., Symonds, P., Bertrand, A. **(1988)**. *Varietal and geographic classification of French red wines in terms of elements, amino acids and aromatic alcohols*. Journal Science of Food Agriculture. 45, 25-41 .

Fell, A. J., Dykes, S. I., Nicolau, L., Kilmartin, P. A. **(2007)**. *Electrochemical microoxidation of red wine*. American Journal of Enology and Viticulture. 58, 443-450.

Fernández de Simon, B., Cadahía, E., Conde, E., García- Vallejo, M. C. **(1996)**. *Low molecular weight organic compounds in Spanish oak woods*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 44 (6), 1507–1511.

Ferrarini, R., Girardi, F., De Conti, D., Castellari, M. **(2001)**. *Esperienze di applicazione della microossigenazione come tecnica d'affinamento dei vini*. Industrie delle bevande. 30 (172), 116–118, 122.

Flecknoe-Brown, A. **(2004)**. *Controlled permeability moulded wine tanks. New developments in polymer catalyst technology*. The Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker. 480, 59-61.

Flecknoe-Brown, A. **(2005)**. *Oxygen-permeable polyethylene vessels: a new approach to wine maturation*. The Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker. 494, 53-57.

Flecknoe-Brown, A. **(2006)**. *“Difusive” methods of oxygenating wine: Better, lower cost barrel replacement*. The Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker. 511, 64-69.

Fornairon-Bonnefond, C., Salmon, J. M. **(2003)**. *Impact of oxygen consumption by yeast lees on the autolysis phenomenon during simulation of wine aging on lees*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51(9), 2584–2590.

Francis, I., Newton, J., L. **(2005)**. *Determining wine aroma from compositional data*. Australian Journal of Grape and Wine Research. Vol.11, No. 2, (Jun 2008), 114–126. ISSN: 1755-0238.

Francis, I., L., Newton, J., L. **(2006)**. *Determining wine aroma from compositional data*. Australian Journal of Grape and Wine Research. 11, 114-126.

Freitas A.A., Dias L.G., Macanita A.A.L., Quina F.H. **(2011)**. *Substituent effects on the pH dependent multiequilibria of flavylum salt analogs of anthocyanins*. Journal of Physical Organic Chemistry. 24 (12) :1201-1208.

Fischer, U., Noble, A. C. **(1994)**. *The effect of ethanol, catechin concentration, and pH, on sourness and bitterness of wine*. American Journal of Enology and Viticulture. 45, 6–10.

Fukaya, M., Tayama, K., Okumura, H., Kawamura, Y., Beppu, T. **(1989)**. *Purification and characterization of membrane-bound aldehyde dehydrogenase from Acetobacter polyoxygenes sp. Nov.* Agricultural and Biological Chemistry. 32, 176-180.

Fulcrand, H.; Cameira dos Santos, P.; Sarni-Machado, P.; Cheynier, V.; Favre-Bonvin, J. **(1996)**. *Structure of new anthocyanin derived wine pigments*. Journal of Chemistry Society, Perkin Trans. 1. 7, 735-739.

Fulcrand, H., Benabdejalil, C., Rigaud, J., Cheynier, V., Moutounet, M. **(1998)**. *A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins*. Phytochemistry. 47, 1401–1407.

Fulcrand, H., Dueñas, M., Salas, E., Cheynier, V. **(2006)**. *Phenolic reactions during winemaking and aging*. American Journal of Enology and Viticulture. 57, 289–297.

Fugelsang, K., Edwards, C., **(2007)**. *Wine Microbiology, Practical Applications and Procedures*. Second edition. The Chapman & Hall Enology Library, UK. 65-75.

García-Carpintero, E. G., Gómez Gallego, M. A., Sánchez-Palomo, E., González Viñas, M. A. **(2011)**. *Sensory descriptive analysis of Bobal red wines treated with oak chips at different stages of winemaking*. Australian Journal of Grape and Wine Research. 17 (3), 368-377.

García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martínez-Rodríguez, A. J., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V. **(2007)**. *Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine*. Food Control. 19, 835-841.

Garde-Cerdán, T., Ancín-Azpilicueta, C. **(2006)**. *Review of quality factors on wine ageing in oak barrels*. Trends in Food Science and Technology. 17(8), 438-447.

Garrido, J., Borges, F. **(2013)**. *Wine and grape polyphenols – A chemical perspective*. Food Research International. 54, 1844-1858.



Gawel, R. **(1998)**. *Red wine astringency: a review*. Australian Journal Grape Wine Research. 4, 74-95.

Gay, M., Apetrei, C., Nevares, I., Del Alamo, M., Zurro, J., Prieto, N. **(2010)**. *Application of an electronic tongue to study the effect of the use of pieces of wood and micro-oxygenation in the aging of red wine*. Electrochimica Acta. 55(22), 6782-6788.

Glories, Y. **(1978)**. *Recherches sur la matière colorante des vins rouges*. PhD Thesis. University of Bordeaux II (France).

Glories, Y. **(1984)**. *La couleur des vins rouges 2<sup>e</sup> partie*. Connaissance de la Vigne et du Vin. 18, 253-271.

Glories, Y., Saint-Criq, N., Vivas, N., Augustin, M. **(1996)**. Identification et dosage de la procyanidine A<sub>2</sub> dans les raisins et les vins de Vitis Vinifera L. Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon et Merlot. 18<sup>th</sup> International Conference of Polyphenols Group. Bordeaux, Vol 1: 153.

Gómez-Plaza, E., Gil-Muñoz, R., López-Roca, J. M., Martínez-Cutillas, A. **(2001)**. *Phenolic compounds and colour stability of red wines: Effect of skin maceration time*. American Journal of Enology and Viticulture. 52, 271–275.

Gómez-Plaza, E., Cano-López, M. **(2011)**. *A review on micro-oxygenation of red wines: Claims, benefits and the underlying Chemistry*. Food Chemistry. 125, 1131-1140.

Haslam, E. **(1980)**. *In Vino veritas: Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines*. Phytochemistry. 16, 1625–1670.

Haslam, E. **(1998)**. *Taste, bitterness and astringency*. In E. Haslam (Ed.), Practical polyphenolics from structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge: Cambridge University Press. 178-225.

He, F., Mu, L., Yan, G. –L., Liang, N.-N., Pan, Q. – H., Wang, J. **(2010)**. *Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes*. Molecules. 15 (12), 9057-9091.

Henick-Kling, T. **(1988)**. *Yeast and bacterial control in winemaking*. In: Linskens, H. F., Jackson, J., F. (Eds.) Wine Analysis. Springer-Verlag. Berlin, 276.316.

Heredia, F., Francia-Aricha, E., Rivas-Gonzalo, J., Vicario, I., Santos-Buelga, C. **(1998)**. *Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes – I. pH effect*. Food Chemistry. 63, 491-498.

Heresztyn, T. **(1986)**. *Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by Brettanomyces yeast*. Archives of Microbiology. 146, 96–98.

Hermosín Gutiérrez, I., Sánchez-Palomo Lorenzo, E., Vicario Espinosa, A. **(2005)**. *Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah*. Food Chemistry. 92, 269–283.

Hernández, T., Estrella, I., Pérez-Gordo, M., Alegría, E-G., Tenorio, C., Ruiz-Larrea, F. **(2007)**. *Contribution of Oenococcus oeni and Lactobacillus plantarum to the non anthocyanin phenolic composition of red wine during malolactic fermentation*. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 55, 5260–5266.

Hollman, P. C. H., Arts, I. C. W. **(2000)**. *Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden*. Journal Science Food Agriculture. 80, 1081-1093.

Hugenholtz, J., Starrenburg, M. J. C. **(1992)**. *Diacetyl production by different strains of Lactococcus lactis subsp. Lactis var. diacetylactis and Leuconostoc spp.* Applied Microbiology and Biotechnology. 38, 17-20.

International organization of vine and wine (O.I.V.) **(2008)**. *Compendium of international methods of wine and must analysis*. Vol.1 & 2.

Iacobucci, G. A., Sweeny, J., G. **(1983)**. *The chemistry of anthocyanins, anthocyanidins, and related flavilium salts*. Tetrahedron letters. 39, 3005-3012.

Jackowetz, J. N., Dierschke, S, E., Mira de Orduña, R. **(2011)**. *Multifactorial analysis of acetaldehyde kinetics during alcoholic fermentation by Saccharomyces cerevisiae*. Food Research Institute. 44, 310-316.

Jackowetz, N., Li, E., Mira de Orduña, R. **(2011-3)** . *Sulphur Dioxide Content of Wines: the Role of Winemaking and Carbonyl Compounds*. Research Focus. Cornell Viticulture and Enology.

Jackson, D. I., Lombard, P. B. **(1993)**. *Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality – a review*. American Journal of Enology and Viticulture. 44, 409-430.

Jackson, R. S. **(2000)**. *Principles, practice and perception*. Wine science. San Diego, CA: Academic Press.

Jackson, R. S. **(2008)**. *Principles and applications*. Wine Science. San Diego, California, EE.UU., Elsevier.

Jordão, A.M. **(1999)**. *Caracterização das proantocianidinas dos engaços em Vitis vinifera L. Evolução ao longo da maturação das castas Touriga Francesa, Castelão Francês e Viosinho*. Tese de Mestrado para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Técnica de Lisboa.

Jordheim M, Fossen T, Andersen ØM. **(2006)**. *Characterization of hemiacetal forms of anthocyanidin 3-O-b-Glycopyranosides*. Journal of Agriculture Food Chemistry. 54(25), 9340-9346.

Jurd, L. **(1964)**. *Reaction involved in sulfite bleaching of anthocyanins*. Journal of Food Science. 29, 16-19.

Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., Ribereau-Gayon, P. **(1984)**. *Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine*. Applied and Environmental Microbiology. 48, 153-156.

Kallithralra, S., Bakker, J., Clifford, M. N. **(1997)**. *Evaluation of bitterness and astringency of (+)-catechin and (-)-epicatechin in red wine and in model solution*. Journal Sensory Studies. 12, 25-37.

Kelly, M., Wollan, D. **(2003)**. *Micro-oxygenation of wine in barrels*. The Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker. 325-331.

Kliewer, W. M. **(1965)**. *American Journal of Enology and Viticulture*. 18, 87.

Koponen, J. M., Happonen, A. M., Mattila, P. H., Törrönen, A. R. **(2007)**. Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(4), 1612-1619.

Kurtzman, C., Fell, J. W. **(2000)**. *The yeasts, a taxonomic study* (4th ed.). Amsterdam: Elsevier Science Publisher BV.

Llaudy, M. C., Roser Canals, González-Manzano, S., Canals, J. M., Santos-Buelga, C., Zamora, F. **(2006)**. *Influence of Micro-Oxygenation Treatment before Oak Aging on Phenolic Compounds Composition, Astringency, and Color of Red Wine*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (12), 4246-4252.

Lemaire, T. **(1995)**. *La micro-oxygénation des vins' Report for the requirements of the Diplôme National d'Oenologie* (École Nationale Supérieure Agronomique: Montpellier, France).

Lemaire, T., Gilis, J. F., Fort, J. -P., Ducournau, P. **(2002)**. *Micro-oxygenation in extended maceration and early stages of red wine maturation maturation-immediate effects and long term consequences*. In: Proceedings of the Eleventh Australian Wine Industry Technical Conference, 33-43. Blair, R. J., Williams, P. J., Høj, P. B., Eds. *Australian Wine Industry Technical Conference Inc. Adelaide*.

Lepadatu, V., Alexu, A., Mudjaba, F. **(1972)**. *Les anthocyanes. Variation de leur teneur selon le cépage et l'écosystème*. *Bulletin de O.I.V.* 497-498: 650-666.

Lesica, M., Kosmerl, T. **(2009)**. *Micro-oxygenation of red wines*. *Acta Agriculturae Slovenica*. 93, 327 – 336.

Lee, C. Y., Jaworski, A. **(1989)**. *Major phenolic compounds in ripening white grapes*. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1, 43-46.

Lee, D., Swinny, E., Asenstorfer, R., Jones, G. **(2004)**. *Factors affecting the formation of red wine pigments*. In A. Waterhouse & J. A. Kennedy (Eds.), *Red wine color. Revealing*

*the mysteries*. ACS symposium series 886. 125–142. Washington: American Chemical Society.

Li, E., Mira de Orduña, R. **(2010)**. *Evaluation of the acetaldehyde production and degradation potential of 26 enological Saccharomyces and non-Saccharomyces yeast strains in a resting cell model systems*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.

Loch, R. **(2002)**. *Micro-oxygenation: A large winery case study*. In *Proceedings of the ASVO seminar uses of gases in winemaking*. Adelaide: Australian Society of Viticulture and Oenology. 45-53.

Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M. **(2003)**. *Spoilage yeasts in the wine industry*. International Journal of Food Microbiology. 86 (1e2), 23e50.

Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M. **(2006)**. *Food spoilage microorganisms*. Boca Raton: Woodhead Publishing.

Macheix, J. J., Fleuriot, A., Billot, J. **(1990)**. *Fruit phenolics*. Boca Raton, Florida: CRC Press. 323-332.

Malfeito-Ferreira, M. **(2005)**. *Avances recientes en el control de Brettanomyces/Dekkera bruxellensis en vinos*. Zaragoza, Spain: Enotour Agrovín.

Malien-Aubert, C., Dangles, O., Amiot, M. J. **(2002)**. *Influence of procyanidins on the color stability of oenin solutions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50(11), 3299–3305.

Martineau, B., Acree, T., Henick-Kling, T. **(1994)**. *A simple and accurate GC/MS method for the quantitative analysis of diacetyl in beer and wine*. Biotechnology and Technology. 8, 7-12.

Martineau, B., Henick-Kling, T. **(1995a)**. *Formation and degradation of diacetyl in wine during alcoholic fermentetio with Saccharomyces cerevisiae strain EC 1118 and malolactic fermentation with Leuconostoc oenos strain MCW*. American Journal of Enology and Viticulture. 46, 442-448.

Martineau, B., Henick-Kling, T. **(1995b)**. *Performance and diacetyl production of commercial strains of malolactic bacteria in wine*. Journal Applied of Bacteriology. 78, 526-536.

Mateus, N., De Freitas, V. **(2001a)**. *Evolution and stability of anthocyanin-derived pigments during port wine ageing*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49, 5217-5222.

Mateus, N.; Silva, A. M. S.; Vercauteren, J.; De Freitas, V. **(2001)**. *Occurrence of anthocyanin-derived pigments in red wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49, 4836-4840.

Mateus, N., Silva, A. M. S., Rivas-Gonzalo, J. C., Santos-Buelga, C., De Freitas, V. A. P. **(2002)**. Journal of Agricultural Food Chemistry. 50, 2110.

Mateus, N., Carvalho, E., Luis, C., De Freitas, V. **(2004)**. *Influence of the tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein–tannin aggregates*. Analytica Chimica Acta. 513(1), 135–140.

Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., Velasco, R. **(2006)**. *Metabolite profiling of grape; Flavonols and anthocyanins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54(20), 7692-7702.

Mattivi, F., Vrhovsek, U., Masuero, D., Trainotti, D. **(2009)**. *Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varietie*. Australian Journal of Grape and Wine Research. Volume 15(1), 27–35.

Mazza, G., Brouillard, R. **(1987)**. *Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products*. Food Chemistry. 25, 207-225.

McCord, J. **(2003)**. *Appication of toasted oak and micro-oxygenation to ageing of Cabernet Sauvignon wines*. Australia and New Zealand Grapegrower and Winemaker. 474, 43-53.

Mcrae, J. M., Kennedy, J. A. **(2011)**. *Wine and Grape Tannin Interactions with Salivary Proteins and Their Impact on Astringency: A Review of Current Research*. 16(3), 2348-2364.

Mewes, D., Wiemann, D. **(2003)**. *Two-phase flow with mass transfer in bubble columns*. Chemical Engineering Technology. 26, 862-868.

Moine-Ledoux, V., Dubourdieu, D. **(1997)**. *Molecular interpretation of the improvement of protein stability in white wines during their ageing on the lees*. Revue des Oenologues et des Techniques Vitivinicoles et Oenologiques. 86, 11–14.

Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B. **(2005a)**. *Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle. I. Anthocyanins and pyroanthocyanins*. European Food Research Technology. 220, 607-614.

Monagas, M., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C. **(2005b)**. *Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle. II. Non-anthocyanins phenolic compounds*. European Food Research Technology. 220, 331-340.

Morata, A., Calderón, F., González, M. C., Gómez-Cordoves, M. C., Suárez, J. A. **(2007)**. *Formation of the highly stable pyranoanthocyanins (Vitisina A and B) in red wines by the addition of pyruvic acid and acetaldehyde*. Food Chemistry. 100, 1144–1152.

Mora-Soumille N, Al Bittar S, Rosa M, Dangles O. **(2013)**. *Analogs of anthocyanins with a 3',4'-dihydroxy substitution: synthesis and investigation of their acid-base, hydration, metal binding and hydrogen-donating properties in aqueous solution*. Dyes and Pigments. 96(1), 7-15.

Morris, J. R., Cawthon, D. L., Sims, C. A. **(1983)**. *Effects of excessive potassium levels on pH, acidity and color of fresh and stored grape juice*. American Journal of Enology and Viticulture. 34, 35-39.

Moutounet, M., Ducournau, P., Chassin, M., Lemaire, T. **(1996)**. *Appareillage d'apport d'oxugène aux vins. Son intérêt technologique*. In A. Lonvaud-Funel (Ed.), Oenologie 95. 5e symposium international d'oenologie. 411-414, Paris: Lavoisier Technique et Documentation.

Moutounet, M., Rigaud, J., Souquet, J. M., Cheynier, V. **(1996)**. *Caractérisation structurale des tanins de la baie de raisin. Quelques exemples de l'incidence du cépage, du terroir et du mode de conduite de la vigne*. Bulletin de O.I.V. 738-784: 433-443.

Moutounet, M., Mazauric, J. P., Saint-Pierre, B., Hanocq, J. F. **(1998)**. *Tonnellerie*. Journal of Science of Technology. 4, 131–145.

Nel, L. **(2001)**. *The use of micro-oxygenation technique. Wynboer: A technical guide for wine producers*. <<http://www.wynboer.co.za/recentarticles/0101technique.php3>>.

Nevares, I., Del Alamo, M. **(2008)**. *Measurement of dissolved oxygen during red wines tank aging with chips and micro-oxygenation*. Analytica Chimica Acta. 621, 68–78.

Noble, A. C. **(1994)**. *Bitterness in wine*. Physiology and Behavior. 6, 1251-1255.

Nouguer, T.; Marty, J. L. **(1995)**. *Enzyme Microbiological Technology*. 17, 453.

Oliveira, C. M., Ferreira, A. C. S., De Freitas, V., Silva, A. M. S. **(2011)**. *Oxidation mechanisms occurring in wines*. Food Research International. 44, 1115-1126.

Oliveira, J., Mateus, N., De Freitas, V. **(2014)**. *Previous and recent advances in pyranoanthocyanins equilibria in aqueous solution*. Dyes and Pigments. 100, 190-200.

Ortega Heras, M., Rivero-Perez, M., Perez- Magariño, S., Gonzalez-Huerta, C., Gonzelez-Sanjose, M. L. **(2008)**. *Changes in the volatile composition of red wines during aging in oak barrels due to micro-oxygenation treatment applied before malolatic fermentation*. European Food Research Technology. 226, 1485-1493.

Ortega- Heres, M., Pérez-Magariño, S., Cano-Mozo, E., González-San José, M. L. **(2010)**. *Differences in the phenolic composition and sensory profile between red wines aged in oak barrels and wines aged with oak chips*. LWT – Food Science and Technology. 43(10), 1533-1541.

Osborne, J., Mira de Orduña, R., Pilone, G., Liu, S. **(2000)**. *Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria*. FEMS Microbiology Letters. 191, 51–55.



Osborne, J. P., Dubé Morneau, A., Mira de Orduña, R. **(2006)**. *Degradation of free and sulphur-dioxide-bound acetaldehyde by malolactic lactic acid bacteria in white wine*. Journal of Applied Microbiology. 101, 474-479.

Ozawa, T., Lilley, T. H., Haslam, E. **(1987)**. *Polyphenol interactions. 3. – Astringency and the loss of astringency in ripening fruit*. Phytochemistry. 26(11), 2937-2942.

Pan, W., Jussier, D., Terrade, N., Yada, R. Y., Mira de Orduña, R. **(2011)**. *Kinetics of sugars, organic acids and acetaldehyde during simultaneous yeast-bacterial fermentations of white wine at different pH values*. Food Research Institute. 44, 660-666.

Parish, M., Wollan, D., Paul, R., **(2000)**. *Micro-oxigenation. A review*. The Australian Grapegrower and Winemaker. 438a, 47-50.

Paul, R. **(2002)**. *Micro-oxigenation – Where now? In proceedings of the ASVO seminar uses of gases in winemaking*. Adelaide: Australian Society of Viticulture and Oenologie. 23-27.

Paul, R., Kelly, M. **(2005)**. *Diffusion – a new approach to micro-oxygenation*. In R. J. Blair, P. J. Williams, I. S. Pretorius (Eds.), Proceedings of the 12<sup>th</sup> Australian wine industry technical conference. Adelaide: Australian Society of Viticulture and Oenology. 23-27.

Peleg, H., Bodine, K. K., Noble, A. C. **(1998)**. *The influence of acid on astringency of alum and phenolic compounds*. Chemical senses. 23, 371-378.

Pellerin, P., Vidal, S., Williams, P., Brillouet, J. **(1995)**. *Characterization of five type II arabinogalactan-protein complexes from red wine with increasing uronic acid content*. Carbohydrate Research. 277, 135-143.

Pellerin, P., Doco, T., Vidal, S., Williams, P., Brillouet, J., O'Neil, M. **(1996)**. *Structural Characterization of red wine rhamnogalacturonan II*. Carbohydrate Research. 190, 183-197.

Pérez-Magariño, S., Sánchez-Iglesias, M., Ortega-Heras, M., González-Huerta, C., González-Sanjosé, M. L. **(2007)**. *Colour stabilization of red wines by micro-oxygenation treatment before malolactic fermentation*. Food Chemistry. 101, 881–893.

Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., Cano-Mozo, E., González-Sanjosé, M. L. (2009). *The influence of oak chips, micro-oxygenation treatment, and grape variety on colour, and anthocyanin and phenolic composition of red wines.* Journal of Food Composition and Analysis. 22, 204–211.

Peynaud, E. (1984). *Knowing and making wine*. John Wiley & Sons.

Pina F, Benedito L, Melo MJ, Parola AJ, Bernardo A. (1996). *Photochemistry of 3,4'-dimethoxy-7-hydroxyflavylium chloride e photochromism and excited-state proton transfer.* Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions. 92(10), 1693-9.

Pina F, Benedito L, Melo JM, Parola AJ, Lima JC, Macanita AL. (1997). *Structural transformations of the synthetic salt 4',7-dihydroxyflavylium chloride in acid and basic aqueous solutions* .1. Ground state. Anales De Quimica. 93(2), 111-8.

Pissarra, J., Lourenco, S., González-Paramás, A. M., Mateus, N., Santos-Buelga, C., De Freitas, V. (2004). *Formation of new anthocyanin-alkyl/aryl-flavanol pigments in model solutions.* Analytica Chimica Acta. 513, 215–216.

Poncet-Legrand, C., Doco, T., Williams, P., Vernhet, A. (2007). *Inhibition of grape seed tannin aggregation by wine mannoproteins: Effect of polysaccharide molecular weight.* American Journal of Enology and Viticulture. 58(1), 87–91.

Pontallier, P., Ribereau-Gayon, P. (1983). *Influence de l'aération et du sulfitage sur l'évolution de la matière colorant des vins rouges au cours de la phase d'élevage.* Connaissance de la Vigne et du Vin. 17(2), 105–120.

Porretta, S.; Sandei, L. (1991). Food Chemistry. 39, 51.

Postel, W., Meier, B. (1983). *The behavior of 2-acetolactate, 2-acetohydroxybutyrate, diacetyl, 2,3-pentanedione and acetoin during malolactic fermentation in wine.* Lebensm. Untersuch. Forsch. 176, 356-359.

Prieur, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. (1994). *Oligomeric and Polymeric procyanidins from grape seeds.* Phytochemistry. 36, 781-784.

Quinn, K. M., Singleton, V. L. **(1985)**. *Isolations and identification of ellagitannins from white oak and an estimation of their roles in wine*. American Journal of Enology and Viticulture. 36, 148-155.

Ramos, A., Lolkema, J. S., Konings, W. N., Santos, H. **(1995)**. *Enzyme basis for pH regulation of citrate and pyruvate metabolism by *Leuconostoc oenos**. Applied and Environmental Microbiology. 61, 1303 -1310.

Ramos, A., Santos, H. **(1996)**. *Citrate and sugar cofermentation in *Leuconostoc oenus*, a <sup>13</sup>C NMR study*. Applied and Environmental Microbiology. 62, 2577-2585.

Rankine, B. **(1988)**. *Blending: A most important aspect of winemaking*. Australian Grapegrower Winemaker. 289, 17–18.

Rapp, A., *Foreign and undesirable flavor in wine*. 151-173.

Rauhul, D. **(2009)**. *Usage and formation of sulphur compounds*. In H. König, G. Uden, J. Fröhlich (Eds.), Biology of microorganisms of grapes in must and wines. 181-207. Heidelberg: Springer.

Redus M, Baker DC, Dougall DK. **(1999)**. Rate and equilibrium constants for the dehydration and deprotonation reactions of some monoacylated and glycosylated cyanidin derivatives. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47(8), 3449-54.

Reguant, C., Bordons, A., Arola, L., Roze`s, N. **(2000)**. *Influence of phenolic compounds on the physiology of *Oenococcus oeni* from wine*. Journal of Applied Microbiology. 88, 1065–1071.

Remy, S., Fulcrand, H., Labarde, B., Cheynier, V., Moutounet, M. **(2000)**. *First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin–tannin reactions*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 80, 745–751.

Rentzsch, M., Schwarz, M., Winterhalter, P. **(2007)**. *Pyrananthocyanins – an overview on structures, occurrence, and pathways of formation*. Trends in Food Science & Technology. 18; 526-534.

Ribéreau-Gayon, P. **(1972)**. *Évolution des composés phénoliques au cours de la maturation du raisin. II. Discussion des resultants obtenus en 1969, 1970, et 1971.* Connaissance de la vigne e du vin. 6, 161-175.

Ribéreau-Gayon, P. **(1982)**. *The anthocyanins of grape and wines. Anthocyanins as food colors.* Ed. P. Markakis, Academic Press, New York. 209-244.

Ribéreau-Gayon, P., Pontallier, P., Glories, Y. **(1983)**. *Some interpretations of colour changes in young red wines during their conservation.* Journal of the Science of Food and Agriculture. 34, 505–516.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y. **(1986)**. *Proceedings of the Sixth Australian Wine Industry Technology Conference*. 247.

Ribéreau-Gayon, P. **(1990)**. *Observation sur les composés phénoliques dans les vins rouges du Bordelais en 1987.* Revue Française d'Œnologie. 123, 25-33.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. **(2000)**. *Handbook of Enology*. Wiley: Chichester, U. K., Vol.2, 129-185.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. **(2006)**. *Phenolic compounds. In P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu (Eds.), The chemistry of wine stabilization and treatments. Handbook of enology.* Vol. 2, 141–203. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.

Ricardo Da Silva, J. M.; Cheynier, V.; Souquet, J. M.; Moutounet, M. **(1991)**. *Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining.* Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57, 111-125.

Ricardo Da Silva, J. R. M. **(1995)**. *Estrutura e composição das procianidinas da uva e do vinho: efeitos potenciais na saúde.* 3º Simpósio de vitivinicultura do Alentejo. 2, 343-355.

Ricardo Da Silva, Laureano, O. **(2004)**. *Estabilidade da matéria corante dos vinhos de regiões de clima quente.* Anais de Congressos, 1º WIP.

Rieger, T. **(2000)**. *Micro-oxygenation presents promise with potential peril for quality winemaking*. Vineyard and Winery Management. 83–88.

Riou, V., Vernhet, A., Doco, T., Moutounet, M. **(2001)**. *Aggregation of grape seed tannins in model wine-effect of wine polysaccharides*. Food Hydrocolloids. 16, 17-23.

Riou, V., Vernhet, A., Doco, T., Moutounet, M. **(2002)**. *Aggregation of grape seed tannins in model-wine-effect of wine polysaccharides*. Food Hydrocolloids. 16, 17-23.

Rivas, G., Alcalde-Eon, C., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J., Escribano-Bailón, M. T. **(2005)**. *Behaviour and characterisation of the colour during red wine making and maturation*. Analytica Chimica Acta.

Rivas-Gonzalo, J. C., Bravo-Haro, S., Santos-Buelga, C. **(1993)**. *Detection of compounds formed through the reaction of malvidin 3-mono-glucoside and catechin in the presence of acetaldehyde*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 43, 1444-1449.

Rivas-Gonzalo, J., Bravo-Haro, S., Santos-Buelga, C. **(1995)**. *Detection of compounds formed through the reaction of malvidin-3-monoglucoside and catechin in the presence of acetaldehyde*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 43, 1444–1449.

Robichaud, J. L., Noble, A. C. **(1990)**. *Astringency and bitterness of selected phenolics in wine*. Journal of Science of Food and Agriculture. 53, 343-353.

Robinson, W. B., Weirs, L. D., Bertino, J. J., Mattick, L. R. **(1966)**. *The relation of anthocyanin composition to color stability of New York State wines*. American Journal of Enology and Viticulture. 17(3), 178–184.

Roggero, J. P., Coen, S., Archier, P., Rocheville-Divorne, C. **(1987)**. *Étude par CLHP de la reaction glucoside de malvidine-acetaldehyde-composé phénolique*. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin. 21, 163-168.

Romano, A., Perello, M., Revel, G., Lonvaud-Funel, A. **(2008)**. *Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine*. Journal of Applied Microbiology. 104(6), 1577e1585.

Rozès, N., Arola, L., Bordons, A. **(2003)**. *Effect of phenolic compounds on the co-metabolism of citric acid and sugars by Oenococcus oeni from wine*. Letters in Applied Microbiology. 36, 337–341.

Salagoity-Auguste, M.H., Bertrand, A. **(1984)**. *Wine phenolics – analysis of low molecular weight components by HPLC*. Journal of Science Food Agriculture. 35, 1241-124.

Salmon, J. M., Fornairon-Bonnefond, C., Mazauric, J. P., Moutounet, M. **(2000)**. *Oxygen consumption by wine lees: Impact on lees integrity wine aging*. Food Chemistry. 71(4), 519–528.

Santos H, Turner DL, Lima JC, Figueiredo P, Pina FS, Macanita AL. **(1993)**. *Elucidation of the multiple equilibria of malvin in aqueous-solution by one-dimensional and 2-dimensional NMR*. Phytochemistry. 33 (5), 1227- 1232.

Sartini E., Arfelli, G., Fabian, A., Piva, A. **(2007)**. *Influence of chips, lees, and micro-oxygenation during wine aging on the phenolic composition of a red Sangiovese wine*. Food Chemistry. 104, 1599-1604.

Saucier, C., Guerra, C., Laguerre, M., Glories, Y. **(1997a)**. *(+)-catechin-acetaldehyde condensation products in relation with wine-ageing*. Phytochemistry. 46, 229-234.

Saucier, C., Guerra, C., Laguerre, M., Glories, Y. **(1997b)**. *Characterization of (+)-catechin-acetaldehyde polymers: a model for colloidal state of wine polyphenols*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45, 1045-1049.

Saulnier, L., Brillouet, J.-M., Moutounet, M., Hervé du Penhoat, C., Michon, V. **(1992)**. *New investigations of the structure of grape arabinogalactan-protein*. Carbohydrate Research. 224, 219-235.

Schuster, M. **(2000)**. *O Essencial sobre a prova*. Livros Cotovia. 30-37.

Schwarz, M.; Wabnitz, T. C.; Winterhalter, P. **(2003)**. *Pathway leading to the formation of anthocyanin-vinylphenol adducts and related pigments in red wines*. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 51, 3682-3687.

Seitz, E. W., Sandine, W. E., Elliker, P.R., Day, E. A. **(1963)**. *Studies on diacetyl biosynthesis by Streptococcus diacetilactis*. Canadian Journal of Microbiology. 9, 431-441.

Semichon, L. **(1927)**. *Les pectines des raisins et le moelleux des vins*. Chimie et Industrie. 17, 25-32.

Silhavy, K., Mandl, K. **(2006)**. *Acetobacter tropicalis in spontaneously fermented wines with vinegar fermentation in Austria*. Mitteilungen Klosterneuburg. 56, 102-107.

Silva, L. R., Cleenwerck, I., Rivas, R., Swings, J., Trujillo, M. E., Willems, A., Velázquez, E. **(2006)**. *Acetobacter oeni sp. Nov., isolated from spoiled red wine*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 56, 21-24.

Singleton, V. L. **(1974)**. *Some aspects of the wooden container as a factor in wine maturation*. Advances in Chemistry Series. 137, 254–277.

Singleton, V. L. **(1987)**. *Oxygen with phenols and related reactions in must, wines, and models systems: observations and practical implications*. American Journal of Enology and Viticulture. 38, 69-77.

Singleton, V. L., Esau, P. **(1969)**. *Phenolic substances in grapes and wine, and their significance*. Advance in Food Research. 1, 1-282.

Singleton, V. L. **(2001)**. *A survey of wine ageing reactions, especially with oxygen*. In R. Rantz (Ed.), Proceedings of the ASEV 50<sup>th</sup> anniversary annual meeting. Davis, CA: American Society of Enology and Viticulture. 323-336.

Smith, A. K., June, H., Noble, A. C. **(1996)**. *Effects of viscosity on the bitterness and astringency of grape seed tannin*. Food Quality Preferences. 7, 161-166.

Somers, T. C. **(1971)**. *The phenolic nature of wine pigments*. Phytochemistry. 10, 2175–2186.

Somers, T. C., Evans, M. E. **(1976)**. *Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO<sub>2</sub>, “Chemical Age”*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 28, 279-287.

Souquet, R. M.; Cheynier, V.; Manchado, P.S.; Moutounet, M. **(1996)**. *Les composés phénoliques du raisin*. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin. Hors Série, Martillac, France. 99-107.

Speckman, R. A., Collins, E. B. **(1968)**. *Diacetyl biosynthesis in Streptococcus diacetilactis and Leuconostoc citrovorum*. Journal of Bacteriology. 95, 174-180.

Spillman, P. **(1999)**. *Wine quality biased inherent in comparison of oak chips and barrel system*. Wine Industry Journal. 14(2), 25–33.

Stadhoudres, J. **(1974)**. *Dairy starter cultures*. Milchwissenschaft. 29, 329-337.

Stead, D. **(1993)**. *The effect of hydroxycinnamic acids on the growth of wine-spoilage lactic acid bacteria*. Journal of Applied Bacteriology. 75, 135–141.

Suarez, R., Suarez-Lepe, J. A., Morata, A., Calderón, F. **(2007)**. *The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera Brettanomyces and Dekkera: A review*. Food Chemistry. 102, 10–21.

Sudraud, P. **(1958)**. *Interprétation des courbes d'absorption des vins rouges*. Annales de Technologie Agricole. 7, 203-208.

Sun, B. S.; Spranger, M. I.; Da Silva, R. J. M. **(1996)**. *Extraction of grape seed procyanidins using different organic solvents*. Polyphenols Communications. 96, Bordeaux, France.

Taira, S., Ono, M. **(1997)**. *Redution of astringency in persimmon caused by adhesion oif tannins to cell wall fragments*. Acta Horticultura. 436, 235-241.

Tanaka, T., Takahashi, R., Kouno, I., Nonaka, K. **(1994)**. *Chemical evidence for the de-astringency (insolubilization of tannins) of persimmon fruit*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions. 3013–3022.

Tao, J., Dykes, S., Kilmartin, P. A. **(2007)**. *Effect of SO<sub>2</sub> concentration on polyphenol development during red wine micro-oxygenation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55, 6104–6109.



Tayama, K., Fukaya, M., Okumura, H., Kawamura, Y., Beppu, T. **(1989)**. *Purification and characterization of membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter polyoxygenes* sp.* Applied Microbiology and Biotechnology. 32, 181-185.

Theron, C. **(2007)**. *The role of oxygen in vinification*. Wynboer. <<http://www.wynboer.co.za/recentarticles/200706current.php3>>.

Thompson, R. S., Jacques, D., Haslam, E., Tanner, R. J. N. **(1972)**. *Plant proanthocyanidins. Part I. Introduction; The isolation, structure, and distribution in nature of plant proanthocyanidins.* Journal of Chemical Society. Perkin Trans. 1, 1387-1399.

Timberlake, C. F., Bridle, P. **(1967)**. *Flavylium salts, anthocyanidins and anthocyanins, II Reactions with sulphur dioxide.* Journal of the Science of Food and Agriculture. 18, 479-485.

Timberlake, C. F., Bridle, P. **(1976)**. *Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines.* American Journal of Enology and Viticulture. 27, 97-105.

Timberlake, C. F., Bridle, P. **(1996)**. *Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines.* American Journal of Enology and Viticulture. 27, 97-105.

Tomasset, L. U. **(1998)**. Química Enológica, Ediciones Mundi-prensa: Madri.

Van Neil, C. B., Kluyver, A. J., Derx, H. G. **(1929)**. *Über das Butteraroma.* Biochemische Zeitschrift. 210, 234-251.

Veringa, H. A., Verburg, E. H., Stadhouders, J. **(1984)**. *Determination of diacetyl in dairy products containing  $\alpha$ -acetolactic acid.* Neth. Milk Dairy Journal. 38, 251-263.

Vernhet, A., Pellerin, P., Prieur, C., Osmianski, I., Moutounet, M. **(1996)**. *Charge properties of some grape and wine polysaccharidic and polyphenolic fractions.* American Journal of Enology and Viticulture. 47, 25-30.

Vernhet, A.; Pellerin, P.; Belleville, M. P.; Planque, J.; Moutounet, M. **(1999)**. *Relative impact of major wine polysaccharides on the performance of an organic microfiltration membrane*. American Journal of Enology and Viticulture. 50 (1): 51-56.

Vernhet, A., Poncet-Legrand, C., Docol, T., Williams, P. **(2007)**. *Inhibition of Grape Seed Tannin Aggregation by Wine Mannoproteins: Effect of Polysaccharide Molecular Weight*. American Journal of Enology and Viticulture. Volume 58 (1), 87-91.

Vidal, S., Doco, T., Williams, P., Pellerin, P., York, W. S., O'Neill, M. A., Glushka, J., Darvill, A. G., Albersheim, P. **(2000)**. *Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: evidence for the backbone location of the acetic acid containing oligoglycosyl side chain*. Carbohydrate Research. 326, 277–294.

Vidal, S., Doco, T., Moutounet, M., Pellerin, P. **(2000a)**. *Soluble polysaccharide content at initial time of experimental must preparation*. American Journal of Enology and Viticulture. 52, 53-58.

Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., Waters, E. J. **(2003)**. *The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine like medium*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 83, 564-573.

Vidal, S., Courcoux, P., Francis, L., Williams, P., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Williams, P., Waters, E., Cheynier, V. **(2004b)**. *Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception*. Food Quality and Preference. 15, 209-217.

Vidal, S., Francis, L., Guyot S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., Waters, E. J. **(2004)**. *The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine like-medium*. Journal Science Food Agriculture. 83 (6), 564-573.

Vidal, S., Aagaard, O. **(2008)**. *Oxygen management during vinification and storage of Shiraz wine*. Wine Industry Journal. 23.

Villetaz, J. C., Amad, R. **(1981)**. *Untersuchung des I slichen Neutral-Polysaccharidfraktion von Traubensaft und Wein*. Lebensm-Wiss und Technology. 14, 176-181.

Viriot, C., Scalbert, A., Herve du Penhoat, C. L. M., Moutounet, M. **(1994)**. *Ellagitannins in woods of sessile oak and sweet chestnut dimerization and hydrolysis during wood aging*. Phytochemistry. 36 (5), 1253–1260.

Vivar-Quintana, A. M., Santos-Buelga, C., Francia-Aricha, E., Rivas-Gonzalo, J. C. **(1999)**. Food Science Technology Int. 5, 347-352.

Vivas, N., Glories, Y. **(1996)**. *Role of Oak Wood Ellagitannins in the Oxidation Process of Red Wines During Aging*. American Journal of Enology and Viticulture. Volume 47 (1), 103-107.

Vivas, N. **(2000)**. Bulletin de l'O.I.V. 73, 79.

Vivas, N. **(2000a)**. *Apports récents à la connaissance du chêne de tonnellerie et à l'élevage des vins rouges en barriques*. Bulletin de l'O.I.V. 73 (827-828), 79-108.

Watanabe, M., Iino, S. **(1984)**. *Studies on bacteria isolated from Japanese wines. Growth of the Acetobacter sp. A-1 during fermentation and the storage of grape must and red wine*. Yamanashiken Shokuhin Kogyo Shidojo Kenkyu Hokoku. 16, 13-22.

Waters, E., Pellerin, P., Brillouet, J. **(1994)**. *A Saccharomyces mannoprotein that protects wine from protein haze*. Carbohydrate Polymers. 23, 185-191.

Wetherhouse, A. **(2002)**. *Wine Phenolics*. Annual New York Academic Science. 957, 21-36.

Wetherhouse, A., Laurie, F. **(2006)**. *Oxidation of wine phenolics. A critical evaluation and hypothesis*. American Journal of Enology and Viticulture. 57, 306-312.

Weinges, K. Kaltenhauser, W., Marx, H. D., Nader, E., Nader, F. Perner, J., Seler, D. **(1968)**. *Procyanidins aus fruchten*. Liebigs Annalen der Chemie. 711, 184-204.

Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C. R., Fleer, G. H., Lee, T. H. **(1985)**. *Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review*. American Journal of Enology and Viticulture. 36, 302- 313.

Yoshida, K. et al. **(2003)**. *Plant cell Physiology*. 44, 262.

Zoecklein, B., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., Nury, F. S. **(1995)**. *Wine Analysis and Production*. Chapman & Hall, New York.

Zoecklein, B., Carey, R., Sullivan, P. **(2003)**. *Micro-oxygenation of red table wines*. *Wine East*. 31, 28–33.

Zoecklein, B. **(2007)**. *Factors impacting sulfur-like off odors in wine and winery options*. In *Proceedings of the 8th annual enology and viticulture British Columbia wine grape council conference*.

## Webgrafia

[http://www.oenodev.com/elevage\\_oxygene\\_vin.asp](http://www.oenodev.com/elevage_oxygene_vin.asp) 8 de abril 2014

[http://www.oenodev.com/elevage\\_temperature.asp](http://www.oenodev.com/elevage_temperature.asp) 8 de abril 2014

<http://www.flextank.com.au> 18 de abril 2014

<http://www.cdc.gov/niosh/idlh/intridl4.html> 21 de abril 2014

[http://www.hannacom.pt/pdf/hi\\_84100.pdf](http://www.hannacom.pt/pdf/hi_84100.pdf) 20 de junho 2014

[http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/geral/files/so2\\_conservacao\\_vinhos.pdf](http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/geral/files/so2_conservacao_vinhos.pdf) 20 de junho 2014